

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**BRUNA LOUISE PEREIRA LUZ**

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DA FAMÍLIA DENDROPHYLLIIDAE (CNIDARIA,  
ANTHOZOA) E SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS  
PALEOAMBIENTAIS**

**PONTAL DO PARANÁ**

**MARÇO DE 2015**

**BRUNA LOUISE PEREIRA LUZ**

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DA FAMÍLIA DENDROPHYLLIIDAE (CNIDARIA,  
ANTHOZOA) E SUA CORRELAÇÃO COM VARIÁVEIS  
PALEOAMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos.

Orientador: Marcelo Visentini Kitahara

**PONTAL DO PARANÁ**

**MARÇO DE 2015**

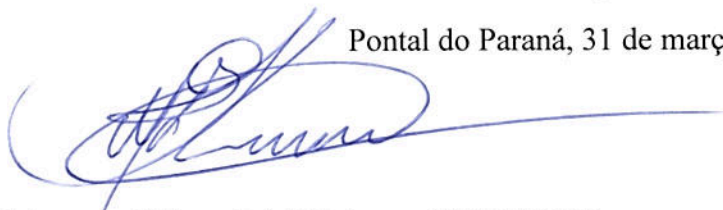
CATALOGAÇÃO NA FONTE:  
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar  
Liliam Maria Orquiza - CRB-9/712

Luz, Bruna Louise Pereira  
L979h História evolutiva da família *Dendrophylliidae* (Cnidaria, Anthozoa) e sua  
correlação com variáveis paleoambientais. / Bruna Louise Pereira Luz. – Pontal do Paraná,  
2015.  
101 f.; 29 cm.  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Visentini Kitahara.  
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas  
Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade  
Federal do Paraná.  
1. *Dendrophylliidae*. 2. Scleractinia. 3. *Dendrophyllia arbuscula*. 4. Evolução. 5.  
Genoma mitocondrial. Paleoambientes. 6. Mudanças climáticas globais. I. Título. II.  
Kitahara, Marcelo Visentini. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 574.526367

Ata da sessão pública de Defesa de Dissertação para obtenção do grau de Mestra em Sistemas Costeiros e Oceânicos, área de concentração Biologia e Ecologia de Sistemas. Aos trinta e um dias do mês de março de 2015, no anfiteatro do Centro de Estudos do Mar, às 13 horas, reuniu-se em sessão pública a Banca Examinadora da prova de Defesa de Dissertação da candidata ao Título de Mestra em Sistemas Costeiros e Oceânicos, **Bruna Louise Pereira Luz**, composta pelos seguintes membros: Dr. Marcelo Visentini Kitahara (UNIFESP), como orientador e presidente, Dr. Maikon Di Domenico (UNICAMP) e Dr. Sergio Nascimento Stampar (UNESP), como examinadores. Após os esclarecimentos prestados pelo candidato às arguições feitas pelos membros da Banca, o Sr. Presidente suspendeu temporariamente a sessão a fim de que a Banca se reunisse em sessão secreta para deliberar sobre o resultado. Reaberta a sessão, o Sr. presidente deu conhecimento a candidata que, de conformidade com o Art. 67 da Resolução 65/09 CEPE, a dissertação foi APROVADA, apenas condicionada à apresentação, no prazo de sessenta dias, da redação final com as alterações sugeridas.

Pontal do Paraná, 31 de março de 2015.



Dr. Marcelo Visentini Kitahara (UNIFESP)  
Orientador e Presidente



Dr. Maikon Di Domenico (UNICAMP)  
Membro Examinador



Dr. Sergio Nascimento Stampar (UNESP)  
Membro Examinador

Título da Dissertação: *"História evolutiva da família Dendrophyllidae (Cnidaria, Anthozoa) e sua correlação com variáveis paleoambientais"*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente eu gostaria de agradecer ao meu orientador Marcelo V. Kitahara pela amizade, pela confiança em me aceitar como sua orientada e por todo o apoio ao longo do desenvolvimento do meu trabalho. Muito do meu desenvolvimento acadêmico e crescimento pessoal e profissional eu devo ao Marcelo, por isso muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio de duas universidades (Universidade Federal do Paraná e USP) e três departamentos (CEM e Zoologia da UFPR, e o CEBIMar da USP). Desta forma gostaria de agradecer ao Centro de Estudos do Mar e à Pós-graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos pelo apoio acadêmico e financeiro, por meio da bolsa de mestrado, a qual tenho que agradecer também a CAPES. Sou grata aos professores da PGSISCO que ao longo deste período foram meus mestres ao passarem o conhecimento deles, bem como amigos e colegas de profissão.

Ao CEBIMar por disponibilizar toda a infraestrutura para a execução das minhas análises e para a minha estadia no alojamento. Agradeço também ao Professor Alvaro Migotto, coordenador do projeto que desenvolvi no mestrado e responsável pelo laboratório, e à Kátia Capel por estar sempre disponível para me auxiliar no que fosse necessário e por me ensinar muitas das análises moleculares. Não poderia deixar de agradecer também aos funcionários do CEBIMar, em especial aos técnicos Elso e Joseilton pela amizade e por estarem sempre à disposição pra me ajudar, me levar em coletas e principalmente pelas conversas durante os cafezinhos, e ao pessoal da administração, Simone Galante, Graça. Mônica e Wagner que sempre foram muito atenciosos, além da amizade.

À pós-graduação em Zoologia da UFPR eu agradeço por me aceitarem em disciplinas ofertadas, as quais foram muito importantes para o meu desenvolvimento acadêmico. Especialmente aos Professores Marcos Barbeitos e Samuel James, além do pessoal do “Sis Mol”, principalmente a Livia Moura que me ensinaram e ajudaram nas análises filogenéticas, além da amizade.

Meu trabalho não seria nada se não fosse pelos meus pais e familiares que me dão todo o apoio. Por isso gostaria de agradecer-los por estarem ao meu lado e

entenderem a minha ausência quando estava em SP ou em Pontal do Sul, além dos longos períodos trabalhando reservada em meu quarto.

Os amigos são muito importantes em nossas vidas e fundamentais nestes períodos de alta pressão, como o mestrado. Durante estes dois anos, tive o prazer de conhecer muitas pessoas de vários Estados e países que de alguma forma, colaboraram com o meu crescimento profissional e pessoal, ao trocarmos conhecimentos e experiências. Dentre estes, gostaria de agradecer em especial as minhas “portuguesas preferidas” Vanessa Mendonça e Inês Leal, à Thábata F. Cândido, Bruno Sayão, Rafael C. Duarte, Jajá, Jéssica TK, Vanessa Dallazuana, Soledad López e Serginho, com quem tive o prazer de morar junto em algum momento ao longo do mestrado, além de todos os momentos de diversão e companheirismo.

Aos amigos da minha turma de mestrado, muitos dos quais estão comigo desde a graduação, em especial a Natiely Dolci e também ao Eliandro Gilbert que sempre me auxiliou com análises e gráficos no R e nunca deixou de me atender para tirar as dúvidas que tive em relação a este programa. Além de todos os amigos do CEM, em especial a Ana Carolina Cabral e a Daniele Conceição que me ensinou e ajudou no início do mestrado, quando as análises moleculares ainda eram algo de outro mundo para mim. Ao Professor Rodolfo Petersen que disponibilizou o laboratório e materiais de consumo para que eu aprendesse as análises moleculares neste início.

Aos Professores Sérgio Stampar, Paulo Lana e Alberto Lindner, e ao Doutor Maikon Di Domenio que aceitaram fazer parte da minha banca examinadora de dissertação de mestrado e que vão de alguma maneira, ajudar no meu crescimento profissional e no desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente tenho muito a agradecer à Deus por toda experiência e aprendizado que tive nestes dois anos, além de todas as pessoas que conheci e amigos que fiz. Nossas vidas são feitas de escolhas, não devo ter feito todas corretamente, mas tenho certeza que entrar no mestrado e finalizar o meu trabalho foi uma das melhores que fiz. Agradeço a todos que de alguma maneira colaboraram para que eu chegasse até aqui, mais madura e responsável, com certeza.

Muito obrigada!!!

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Foto da colônia de *Dendrophyllia arbuscula* coletada na Baía de Seto, Shirahama, Japão, e utilizada para a extração do DNA genômico total.....25
- Figura 2: Mapa do genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula*. Linha pontilhada indica a direção da transcrição. Os genes codificadores de proteína, tRNAs e rDNAs estão abreviados conforme no texto. Regiões em branco representam os espaços intergênicos, com exceção da região entre o COX1 que corresponde ao intron deste gene. O círculo interno destacado em verde indica o intro do ND5.....32
- Figura 3: Frequência dos aminoácidos presentes no genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula*.....34
- Figura 4: Frequência dos códons usados nos genes codificantes de proteína do genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula*.....35
- Figura 5: Reconstrução filogenética da classe Anthozoa. Topologia recuperada através da utilização das bases nucleotídicas dos genes codificadores de proteínas do genoma mt, baseada na análise Máxima Verossimilhança. Os números nos ramos indicam a suporte sh-like (acima) e valor de bootstrap (abaixo) calculados usando os programa PhyML. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like  $\geq 0,990$  e bootstrap  $\geq 90$ ). Os clados formados pelos escleractíneos “basal”, “robustos” e “complexos” são indicados pela barra, verde, roxo e azul, respectivamente. ....37
- Figura 6: Período geológico de ocorrência dos gêneros extintos e de origem dos gêneros existentes (modificado de Cairns, 2001 e Filkorn & Alor 2004) de corais dendrofilídeos, onde asterisco (\*) marca os gêneros utilizados para a calibração da análise de relógio molecular. Os períodos “Pli, Ple e Hol” representam Plioceno, Pleistoceno e Holoceno, respectivamente. ....43
- Figura 7: Distribuição de Dendrophylliidae. a) Registros fósseis datados desde o Cretáceo (ca. 150 M.a.) (fonte: <http://paleodb.science.mq.edu.au>) e b) atual (fonte: <http://iobis.org>). ....44
- Figura 8: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada na análise de relógio molecular relaxado dos marcadores mitocondriais CO1 e 16S rDNA, e nuclear 28S rDNA. Os números nos ramos indicam a probabilidade posterior

(acima) e o suporte sh-like e valor de bootstrap (abaixo) calculados usando os programas Beast e PhyML, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente). As características ecológicas (i.e.: habitat em que ocorrem e estado simbiótico) e morfológicas (i.e.: solitário ou colonial) são representadas pelas diferentes formas e cores relacionadas a cada espécie como: água rasa (<50 m) (quadrado preto); oceano profundo (>100 m) (quadrado branco); águas rasas e profundas (preto e branco); zooxantelado (circulo preto); azooxantelado (circulo branco); simbiose facultativa (circulo preto e branco); solitário (estrela preta); colonial (estrela branca); solitário e colonial (preto e branco); e quasicolonial (cinza).....59

Figura 9: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae por inferência bayesiana, baseada no marcador mitocondrial ribossomal longo (16S rDNA). Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e a probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e MrBayes, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente).....81

Figura 10: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae por inferência bayesiana baseada no marcador Citocromo Oxidase subunidade 1 (CO1). Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e a probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e MrBayes, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente).....83

Figura 11: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada na inferência bayesiana do marcador ribossomal nuclear 28S. Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e a probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e MrBayes, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente).....83

Figura 12: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada em Inferência Bayesiana do concatenamento dos marcadores mitocondriais CO1 e



16S rDNA, e nuclear 28S rDNA. Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e Mrbayes, respectivamente. ....85

Figura 13: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada na análise de máxima verossimilhança do concatenamento dos marcadores mitocondriais CO1 e 16S rDNA, e nuclear 28S rDNA. Os números nos ramos indicam o suporte sh-like (acima) e o valor de bootstrap (abaixo) calculados usando o PhyML. ....85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos primers e sequências projetados para a amplificação das sequências do genoma mitocondrial não contempladas pelos primers universais (Lin et al., 2011) .....	26
Tabela 2: Dados dos genomas mitocondriais utilizados na análise filogenética por Máxima Verossimilhança. ....	28
Tabela 3: Organização do genoma mitocondrial de <i>Dendrophyllia arbuscula</i> . ....	33
Tabela 4: Lista de espécies e das estações de coletas .....	75
Tabela 5: Lista das espécies utilizadas nas análises filogenéticas para os marcadores moleculares mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e o nuclear (28S rDNA), bem como para a concatenação destes <i>locus</i> ; onde “gb” indica a referência de busca do GenBank e “Conc.” representa a concatenação dos genes. ....	77

## RESUMO

Os cnidários da Ordem Scleractinia são os principais formadores de recifes de corais de águas rasas (<50 m) e profundas (>100 m), os quais embora apresentem elevada diversidade e abundância de espécies, estão ameaçados devido, principalmente, as mudanças climáticas que estamos vivenciando. Apesar disso, os escleractíneos persistiram a inúmeras mudanças climáticas ao longo de sua história evolutiva, e acredita-se que adaptações e utilização de refúgios em águas mais profundas provavelmente auxiliaram na sobrevivência da ordem como linhagem. Dentre as 24 famílias recentes de Scleractinia, Dendrophylliidae é uma das poucas considerada monofilética, apesar de apresentar: i) elevada variedade morfológica; ii) representantes em ambientes rasos e profundos; e, conseqüentemente, iii) espécies zooxanteladas, azooxanteladas ou ainda com simbiose facultativa. Entretanto, dados moleculares vêm sugerindo que a maioria dos gêneros são para ou polifiléticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma reconstrução da história evolutiva dos corais dendrofilídeos utilizando marcadores moleculares mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e nuclear (28S rDNA), buscando identificar/correlacionar as principais mudanças ambientais de nível global responsáveis pelos eventos de divergência entre os principais clados recuperados. Adicionalmente, o genoma mitocondrial (mt) de *Dendrophyllia arbuscula* foi descrito e a monofilia da família foi testada através da reconstrução filogenética com base em todos os genes codificadores de proteínas do genoma mt. De forma geral, análises filogenéticas suportaram a monofilia da família, mas colocam em questão a validade da maioria dos gêneros. O ancestral dos dendrofilídeos era provavelmente azooxantelado, solitário e habitava águas profundas, sendo a aquisição da simbiose com zooxantelas um fator facilitador para o estabelecimento de representantes em ambientes de águas rasas. O genoma mt de *D. arbuscula* é similar ao dos demais representantes da família, com maior teor de timina e menor de citosina, resultando em alta quantidade de (A+T) e de Fenilalanina (TTT). Possui 19.088 pb, compreendendo 2 rDNAs (rrnL e rrnS), 2 tRNAs (trnM e trnW) e 13 genes codificantes de proteína (ND1-6; ND4L; ATP6; ATP8, COB; CO1-3), além de dois introns de grupo I interrompendo os genes CO1 e ND5.

## ABSTRACT

Cnidarians of the order Scleractinia are the main builders of shallow water coral reefs (<50 m) and deep (> 100 m), which are characterized by high diversity and abundance of species and great economic and social influence. In general, these ecosystems are threatened mainly due to the current climate changes. In spite of this, the scleractinian coral persisted to numerous climate changes along its evolutionary history. Of the 24 families of the recent order, the Dendrophylliidae have: i) high morphological variety; ii) representatives in shallow and deep environments; and therefore iii) zooxanthellate, azooxanthellate or with facultative symbiosis species. However, molecular data suggesting that most genera of family are para or polyphyletic. Thus, the aim of this work was to perform a reconstruction of the evolutionary history of coral dendrofilideos using mitochondrial (mt) molecular markers (CO1 and 16S rDNA) and nuclear (28S rDNA) and, through its correlation with paleo-environmental aspects, identify global environmental changes potentially responsible for the events of divergence between the recovered clades, which later served to the development of hypotheses about the future of this family facing contemporary global climate change. In addition, to describe the genome mt of *Dendrophyllia arbuscula*, providing information about the genera classification as well as the Dendrophylliidae family, and test the monophyly of family by phylogenetic basis of all the genes encoding proteins mt genome. In general, phylogenetic reconstructions recovered the monophyly of Dendrophylliidae with good branch support and corroborate the hypothesis that the family ancestor was probably azooxanthellate, solitary and inhabited deep water. The acquisition of symbiosis with zooxanthellae possibly facilitated the representatives of this family to explore and to settle in shallow water environments. The genome of mt *D. arbuscula* is similar to that of other representatives of Dendrophyllia family. It has 19 088 bp, comprising 2 rDNAs (rrnL and rrnS), 2 tRNAs (trnM and trnW) and 13 protein-coding genes (ND1-6; ND4L; ATP6; ATP8, COB; CO1-3), and two group I introns interrupting the ND5 and CO1 genes.

## SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO .....</b>	<b>9</b>
 <b>CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>DENDROPHYLLIA ARBUSCULA</i> (SCLERACTINIA, CNIDARIA) E SEU USO NO TESTE DA MONOFILIA DA FAMÍLIA DENDROPHYLLIIDAE .....</b>	<b>17</b>
 <b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
 <b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
 1.1 INTRODUÇÃO .....	20
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
1.2.1 Material: localização e preservação .....	25
1.2.2 Extração e sequenciamento do DNA .....	25
1.2.3 Análise das sequências .....	26
1.2.4 Reconstrução filogenética .....	27
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
1.3.1 Organização e conteúdo genético .....	27
1.3.2 Reconstrução filogenética .....	35
1.4 CONCLUSÃO .....	38
 <b>CAPÍTULO 2: MUDANÇAS CLIMÁTICAS GLOBAIS E A EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA DENDROPHYLLIIDAE (CNIDARIA, SCLERACTINIA) .....</b>	<b>39</b>
 <b>RESUMO .....</b>	<b>40</b>
 <b>ABSTRACT .....</b>	<b>41</b>
 2.1 INTRODUÇÃO .....	42
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
2.2.1 material: localização e preservação .....	49

2.2.2	Extração de DNA, reação de polimerase em cadeia e sequenciamento .....	50
2.2.3	Análises filogenéticas .....	51
2.3	RESULTADOS.....	53
2.3.1	Análise filogenética .....	53
2.3.2	Características ecológicas .....	55
2.3.3	Características morfológicas.....	56
2.3.4	Tempos de divergências e a correlação com mudanças climáticas	57
2.4	DISCUSSÃO.....	59
2.4.1	Relações filogenéticas .....	59
2.4.2	História evolutiva.....	63
2.4.3	características morfológicas e ecológicas ancestrais .....	71
2.5	CONCLUSÃO .....	73
2.6	ANEXOS.....	81
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86

## PREFÁCIO

Os cnidários da Ordem Scleractinia, popularmente conhecidos como corais verdadeiros (Cairns, 2007), são os únicos entre as seis ordens Recentes de Hexacorallia (Cnidaria, Anthozoa) que secretam carbonato de cálcio na forma de aragonita, formando um esqueleto contínuo (Roberts *et al.*, 2009). Esta capacidade faz destes organismos os principais formadores de recifes de águas rasas (<50 m) e profundas (>100 m), os quais são caracterizados pela complexidade tridimensional, fornecendo habitat para outros organismos, sustentando assim, elevada diversidade e abundância de espécies (Stanley, 1981; Knowlton, 2001; Freiwald *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2006). Considerados berços evolutivos e exportadores de diversidade para outros ambientes (Kiessling *et al.*, 2010), os recifes de corais alteram fatores físicos, geológicos e biológicos de um ambiente, como hidrodinâmica, sedimentação e diversidade de espécies (Stanley, 1981; Roberts *et al.*, 2009). Desta forma, além de importantes ecologicamente, os ecossistemas recifais exercem grande influência econômica e social, relacionadas, por exemplo, com o turismo, pesca e proteção da linha de costa (Moberg & Folke, 1999; Buddemeier *et al.*, 2004; Graham & Nash, 2013).

A ordem Scleractinia compreende cerca de 1500 espécies Recentes, divididas em 24 famílias e 220 gêneros (Cairns, 1999), podendo ser solitários, ou seja, constituídas de um único pólipó (e.g.: *Balanophyllia elegans*), coloniais quando há integração de mais de um pólipó (e.g.: *Dendrophyllia alternata*), ou ainda quasicoloniais (Cairns, 1991), quando novos pólipos desprendem dos seus respectivos genitores antes do brotamento de uma terceira geração (e.g.: *Eguchipsammia* spp.). Entretanto, a escassez de caracteres morfológicos associado à elevada plasticidade fenotípica (Cairns, 2001; Forsman *et al.*, 2009), tem limitado seu uso no desenvolvimento de sistemas de classificação satisfatórios, gerando homoplasia e homologia. Mais recentemente, com a utilização de marcadores moleculares, o conhecimento da classificação e história evolutiva destes organismos mudaram significativamente.

Apesar do genoma mitocondrial (mt) dos Anthozoa apresentar taxa de evolução extremamente lenta (van Oppen *et al.*, 1999a; 1999b; Shearer *et al.*, 2002;

Huang *et al.*, 2008), estudos com base em sequências nucleotídicas mitocondriais têm sido bem sucedidos em reconstruções filogenéticas e da história evolutiva da ordem (ver Lin *et al.*, 2011; Kitahara *et al.*, 2014) e de famílias (e.g.: Acroporidae [Fukami *et al.*, 2000]; Dendrophylliidae [ver cap. 2; Arrigoni *et al.*, 2014]). Contudo, filogenias que utilizam dados moleculares são inconsistentes com as classificações baseadas em caracteres morfológicos, principalmente para subordem e família (Romano & Cairns, 2000; Fukami *et al.*, 2004; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kitahara *et al.*, 2010).

A nível de subordem, anteriormente composta por 13 grupos, a ordem Scleractinia é dividida em apenas três clados: “Robusta”, “Complexa” e “Basal” (Romano & Palumbi, 1996; Romano & Cairns, 2000; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kitahara *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Stolarski *et al.*, 2011). Apesar de não possuírem critérios morfológicos definidos, estes clados foram, a princípio, diferenciados pela *robustez* do esqueleto, pelo método de reprodução (Romano & Palumbi, 1996), e também, por características do genoma mt. Desta forma, até pouco tempo atrás, acreditava-se que as espécies que secretam esqueleto relativamente sólido e que se reproduzem assexuadamente por brotação intratentacular pertenciam ao clado “Robusta” (e.g.: *Montastraea franki* e *Stephanocyathus weberianus*) (Romano & Palumbi, 1996), e espécies com esqueletos mais frágeis e reprodução assexuada por brotamento extratentacular, pertencentes ao clado “Complexa”. Com proposição em 2010, o clado “Basal” é representado pelas famílias Gardineriidae e Micrabaciidae, ambas compostas exclusivamente por espécies azooxanteladas, solitárias, e de ocorrência em águas profundas (>200 m), e tidas como linhagem de divergência mais ancestral dentre os escleractíneos Recentes (Kitahara *et al.*, 2010; Stolarski *et al.*, 2011).

Molecularmente, os representantes dos clados supracitados podem ser diferenciados pelo comprimento do genoma mt (mais extenso no clado “Basal” [>20kb], intermediário no clado “Complexa” [17-19.5kb] e reduzido no clado “Robusta” [14-18kb]). Em adição, os corais dos clados “Basal” e “Complexa” possuem um maior número de IGSs (14) do que os corais “Robusta” (9) (ver Chen *et al.*, 2008a; Kitahara *et al.*, 2014), além de possuírem menor concentração de (A+T) (Kitahara *et al.*, 2014). Adicionalmente, são verificadas diferenças no intron que interrompe o gene CO1 entre estas subordens, possivelmente devido a origens distintas deste intron (Lin *et al.*, 2011), e também a



A discrepância entre hipóteses morfológicas e moleculares, ou seja, a polifilia ocorre principalmente, nas famílias compostas majoritariamente por espécies zooxanteladas, ou seja, aquelas restritas a águas rasas (Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Fukami *et al.*, 2008). Uma das explicações propostas para este fato é que os ambientes rasos são mais instáveis do que os de oceano profundo, exercendo assim grande influência no desenvolvimento dos organismos e, conseqüentemente, acarretando em maior plasticidade fenotípica (Rogers, 1999; Bijlsma & Loeschcke, 2005). No entanto, análises de microestruturas esqueléticas suportam filogenias moleculares (Cuif *et al.*, 2003; Janiszewska *et al.*, 2011). Acredita-se que a biomineralização, a qual é determinada por matrizes orgânicas compostas de macromoléculas complexas (proteínas e polissacáridos) que controlam a nucleação, delimitação espacial e organização das unidades básicas microestruturais (Lowenstam & Weiner, 1989), seja um reflexo das características fisiológicas da família e, por isso, não são alteradas por condições ambientais (Janiszewska *et al.*, 2011). Embora existe a possibilidade de que a biomineralização seja influenciada pela simbiose que muitas espécies de corais possuem com zooxantelas – dinoflagelados fotossintetizantes (*Symbiodinium* spp.) – nos tecidos da endoderme (Gautret *et al.*, 1997; Cuif *et al.*, 1999), apesar das zooxantelas poderem influenciar apenas indiretamente a biomineralização pela síntese de precursores que são assimilados por células calicoblásticas para formar a matriz orgânica, a qual é secretada pelo coral, formando assim o seu esqueleto (Puverel *et al.*, 2005).

Quanto à classificação ecológica, os corais escleractíneos podem ser divididos em função da presença/ausência de simbiose com dinoflagelados fotossintetizantes, popularmente conhecidos como zooxantelas. Em resumo, as zooxantelas contribuem com a nutrição e possivelmente acelerando a formação do esqueleto dos corais, recebendo em troca proteção e um fluxo constante de dióxido de carbono utilizado na fotossíntese (Pearse & Muscatine, 1971; Davies, 1984). Os escleractíneos que possuem algas simbióticas são conhecidos como zooxantelados e são restritos a locais/profundidades com intensidade luminosa suficiente para a realização de fotossíntese (Stoddart, 1990). Conseqüentemente, este grupo “ecológico” de corais é o principal formador dos recifes em zonas tropicais e subtropicais oligotróficas rasas - das 777 espécies zooxanteladas, 767 são construtoras de recifes (Roberts *et al.*, 2009). Acredita-se que o sucesso dos zooxantelados nestas regiões deve-se ao suprimento energético fornecido pelas

algas simbióticas que os permite prosperar em um ambiente limitado em nutrientes, bem como ao rápido crescimento e, principalmente, por adaptações morfológicas que traduzem em um aumento da superfície coralínea exposta a luz, o que propicia maior produção fotossintética (Stanley, 2003; Hallock, 2005; Barbeitos *et al.*, 2010; Stanley & Helmle, 2010). Em contrapartida, os corais azooxantelados não realizam simbiose com os dinoflagelados fotossintetizantes, sendo assim, heterotróficos. Suas taxas de crescimento são relativamente mais baixas e das 706 espécies Recentes conhecidas, a maioria é solitária (516 espécies, ou seja 73,5%) (Cairns, 1991; 2007). No entanto, por não serem restritas às zonas fóticas, ocorrem do Ártico ao Antártico, até profundidades de aproximadamente 6.000 m, podendo ser fixas (53,3%), de vida livre (37,5%), ou ainda realizarem divisão transversal (9,2%), gerando um pólipos de vida livre a partir de uma base fixa (Cairns, 2007). Embora ocorram em ampla faixa batimetria, a maioria dos azooxantelados habitam profundidades entre 100-200 m (63,4%) (Cairns, 2007). Entretanto, algumas espécies são exclusivas de águas rasas (e.g.: *Tubastraea diaphana*) e outras são conhecidas apenas a partir de águas mais profundas do que 300 m (e.g.: *Enallopsammia profunda*) (Roberts *et al.*, 2009). Outros corais escleractíneos apresentam simbiose facultativa, ou seja, podem ser zooxantelados ou azooxantelados dependendo do ambiente (e.g.: *Heteropsammia*) (Cairns, 1999).

Os recifes de águas rasas são formados quase que exclusivamente por espécies de corais zooxantelados, destacando-se as pertencentes às famílias Acroporidae, Mussidae, Faviidae e Pocilloporidae (Riegl & Piller, 1999). Em contrapartida, das aproximadamente 90 espécies azooxanteladas que ocorrem nestes ambientes, apenas uma, *Tubastraea micranthus*, é considerada construtora de recife (Roberts *et al.*, 2009). Como extensão do ambiente de água rasa, os “recém” descobertos recifes mesofóticos são caracterizados pela presença de corais zooxantelados, principalmente da família Agariciidae (Kahng *et al.*, 2010). Ao contrário do que se imaginava, estes podem ocorrer em profundidades de até 200 m (Roder *et al.*, 2013) e, para tanto, acredita-se que estas espécies de corais possuem adaptações morfológicas (Hinderstein *et al.*, 2010; Kahng *et al.*, 2010; Kitahara *et al.*, 2012) e fisiológicas, relacionadas com a presença de zooxantelas especializadas a este tipo de ambiente (Frieke *et al.*, 1987; Iglesias-Prieto *et al.*, 2004). Assim, a diversificação de habitats (i.e.: diferentes profundidades e níveis de luminosidade) em que os corais zooxantelados ocorrem pode ser considerada como um reflexo de

populações geneticamente diferentes de *Symbiodinium* que “os habitam” (Rowan & Knowlton, 1995; Coffroth & Santos, 2005).

Em águas frias e profundas, as formações recifais variam de pequenas colônias de corais dispersas em poucos metros a complexos sistemas de dezenas de quilômetros de comprimento com estruturas tridimensionais, comparáveis em tamanho e complexidade aos formados pelos corais de águas rasas de regiões tropicais (Freiwald *et al.*, 2004). Neste ambiente apenas 18 espécies são capazes de formar recifes (Roberts *et al.*, 2009), sendo que das principais construtoras (i. e.: *Lophelia pertusa*; *Madrepora oculata*; *Enallopsammia profunda*; *E. rostrata*; *Goniocorella dumosa*; *Solenosmilia variabilis*; e *Oculina varicosa*), *Lophelia pertusa*, *M. oculata*, e *S. variabilis* são cosmopolitas e figuram entre as espécies de corais com maior distribuição global conhecidas (Rogers, 1999; Freiwald *et al.*, 2004; Davies & Guinotte, 2011). Apesar de muitos escleractíneos azooxantelados serem reportados em profundidades abaixo do horizonte de saturação da aragonita e sob substratos inconsolidados, a distribuição das espécies construtoras citadas acima é, aparentemente, limitada pelo “efeito área”, ou seja, à disponibilidade de substrato duro, bem como à profundidade de compensação da aragonita (>2.000 m de profundidade no Norte do Oceano Atlântico e ~100 m de profundidade no Norte do Oceano Pacífico - Feely *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2009). Outros parâmetros ambientais que afetam a distribuição dos corais neste ambiente são as condições de temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (Freiwald *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2006; Cairns, 2007), as quais estão diretamente atreladas com a hidrodinâmica local.

Apesar da importância ecológica, social e econômica (Moberg & Folke, 1999), os recifes coralíneos vêm sendo ameaçados devido a pressões antrópica, como sobrepesca, eutrofização e assoreamento (Knowlton, 2001; Hughes *et al.*, 2003; Kitahara, 2009). Entretanto, as mudanças climáticas, associadas principalmente com aos gases de efeito estufa e aquecimento global, vêm sendo apontadas como principais desafios à conservação destes ecossistemas (Smith & Buddemeier, 1992; Maier *et al.*, 2009; Veron *et al.*, 2009; Leão *et al.*, 2010), uma vez que o estresse ambiental gerado pelas mesmas pode ser considerado como força modeladora na adaptação e evolução (Bijlsma & Loeschcke, 2005). Entretanto, em nível específico, acredita-se que o efeito deste estresse depende do período de tempo em que estas mudanças ocorrem, ou seja, se elas são rápidas ou abruptas as

espécies não tem tempo suficiente para se adaptarem às novas condições ambientais (Veron, 2008). Entretanto, apesar do aspecto negativo, em alguns casos, mudanças ambientais agindo ao longo de milhares de anos podem também gerar processos adaptativos/evolutivos, como por exemplo, as alterações climáticas que causaram os cinco eventos de extinção em massa conhecidos, os quais são marcados pelo desaparecimento de vários grupos taxonômicos dos registros fósseis, seguido de processos evolutivos, onde novas espécies se originaram (Veron, 2008).

Embora severamente ameaçados, os corais escleractíneos persistiram a inúmeras mudanças climáticas ao longo de sua história evolutiva (Hallam & Cohen, 1989; Kitahara, 2011; Stolarski *et al.*, 2011; Hönsch *et al.*, 2012) e superaram pelo menos cinco grandes eventos de extinção em massa, dos quais dois tiveram provavelmente a acidificação dos oceanos como um dos principais fatores determinantes (Kiessling & Simpson, 2011). Atualmente acredita-se que a ordem surgiu no Ordoviciano médio, a cerca de 450 M.a. (Stolarski *et al.*, 2011), período em que o aumento de nutrientes nos oceanos, combinado com aumento da extensão de plataforma continental devido à transgressão marinha, proporcionou a diversificação de antozoários calcificadores (e.g.: corais rugosos, tabulados e escleractíneos). Resultados de reconstruções evolutivas somados a ocorrência de fósseis indicam que os primeiros organismos do grupo eram solitários, azooxantelados e, provavelmente, “invadiram” águas profundas (>300 m) durante o Ordoviciano (Stolarski *et al.*, 2011). Condições ambientais instáveis somadas à competição com outros antozoários são consideradas como os principais fatores para a colonização dos corais escleractíneos em águas profundas (Kitahara, 2011). Assim, adaptações e a utilização de refúgio em águas mais profundas provavelmente auxiliaram na sobrevivência do grupo como linhagem. No entanto, apesar da resistência a perturbações climáticas globais pretéritas, o futuro do grupo é incerto frente às rápidas mudanças com magnitudes sem precedentes nos últimos 300 M.a. (Kiessling & Simpson, 2011), o que pode diminuir a oportunidade para processos adaptativos auxiliarem na sobrevivência da ordem (Veron *et al.*, 2009).

Em geral, as considerações em relação às mudanças climáticas globais e seus efeitos tem grande repercussão no meio científico, político e público. Entretanto, apesar de não haver um consentimento em relação à configuração do estado atual de mudança climática global, o Planeta não é estático e mudanças no clima e nos organismos que o habitam ocorrem, assim como já aconteceu no

passado (Culver & Rawson, 2000). Desta forma, a compreensão das respostas dos organismos às mudanças climáticas globais pretéritas podem fornecer informações sobre as possíveis consequências das alterações e perturbações ambientais que estamos vivenciando. Assim, o conhecimento da história evolutiva dos corais escleractíneos é importante para formulação de hipóteses não apenas sobre o futuro destes organismos, mas de grande parte da diversidade da Terra, dada a grande importância ecológica dos ecossistemas recifais.

Dentre as famílias de Scleractinia, Dendrophylliidae é uma das poucas considerada monofiléticas (Cairns, 2001; Kitahara *et al.*, 2010; Arrigoni *et al.*, 2014), apesar de apresentar alta variabilidade morfológica e ecológica. Seus representantes podem ser fixos e de vida livre, coloniais, quasicoloniais e solitários, bem como zooxantelados, azooxantelados ou ainda apresentar simbiose facultativa (Cairns, 2001). Em adição, representantes desta família são reportados do infralitoral à 2.165 m de profundidade, bem como em cavernas submarinas (Cairns, 2001; Lam *et al.*, 2008). Assim, uma reconstrução da história evolutiva da família Dendrophylliidae baseada em dados moleculares pode fornecer informações importantes com relação ao desenvolvimento/perda do crescimento colonial em metazoários inferiores, e também a questões relacionadas a adaptações ambientais, eventos de migração entre ambientes rasos e profundos, bem como ao estado simbiótico de seus representantes ao longo de suas respectivas histórias evolutivas. Adicionalmente, uma reconstrução filogenética robusta poderá proporcionar informações importantes para o teste de hipóteses relacionadas aos caracteres ancestrais deste grupo, e através do correlacionamento com aspectos paleoambientais, poderá resultar no desenvolvimento de hipóteses sobre o futuro desta família frente as mudanças climáticas globais que estamos vivenciando. Contudo, as relações filogenéticas dos representantes da família Dendrophylliidae ainda são pouco conhecidas. Em adição, os dendrofilídeos, principalmente as espécies de mar profundo, que compreendem a maior parte da família (91%), são pouco representados na maioria das reconstruções filogenéticas da ordem Scleractinia (Romano & Palumbi, 1996; Veron *et al.*, 1996; Romano & Cairns, 2000; Cairns, 2001; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kerr, 2005; Kitahara *et al.*, 2010).

Desta forma, análises filogenéticas com base em dados moleculares foram realizadas no presente trabalho para uma maior compreensão sobre a sistemática dos corais dendrofilídeos e da sua relação com mudanças climáticas globais. Em

resumo, no capítulo 1 – “Descrição do genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula* (SCLERACTINIA, CNIDARIA) e seu uso no teste da monofilia da família Dendrophylliidae” - é apresentado a descrição do genoma mitocondrial (mt) de *Dendrophyllia arbuscula* e a comparação desse com o genoma mt de outros representantes da família. Adicionalmente, uma reconstrução filogenética com base nos genes codificadores de proteína do genoma mt de *D. arbuscula* é apresentada. No capítulo 2 – “Mudanças climáticas globais e a evolução da família Dendrophylliidae (Cnidaria, Scleractinia)” - foram realizadas reconstruções filogenéticas com base em marcadores moleculares mitocondriais e nuclear de representantes da família Dendrophylliidae e, através de reconstruções filogenéticas que utilizaram técnicas de relógio molecular calibrado com fósseis, foi recuperado o período geológico em que ocorreram os principais eventos de divergência dessa família. Com base nestas análises, as relações filogenéticas dos dendrofilídeos, os caracteres ancestrais da família e as principais mudanças climáticas globais relacionadas com a divergência e especiação dos dendrofilídeos são hipotetizadas e discutidas. Em adição, também são discutidas hipóteses sobre o futuro dos corais escleractíneos frente às mudanças climáticas contemporâneas.

**CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL DE  
*DENDROPHYLLIA ARBUSCULA* (SCLERACTINIA, CNIDARIA)  
E SEU USO NO TESTE DA MONOFILIA DA FAMÍLIA  
DENDROPHYLLIIDAE**

---

## RESUMO

Apesar da alta variabilidade morfológica e ecológica de seus representantes, Dendrophylliidae é uma das poucas famílias pertencentes à ordem Scleractinia considerada monofilética. Entretanto, dados moleculares vêm sugerindo que a maioria dos gêneros da família são para ou polifiléticos. Dentre esses, a falta de caracteres morfológicos únicos para a classificação do gênero *Dendrophyllia*, somado a sua alta variabilidade morfológica e, provavelmente, homoplasia dos seus representantes, são considerados os principais problemas para sua classificação. Assim, nos últimos anos, dados moleculares vêm sendo utilizados visando uma melhor compreensão da sistemática e história evolutiva do grupo. Embora o genoma mitocondrial (mt) de corais escleractíneos seja conservado e com taxa evolutiva lenta, é, de maneira geral, uma ferramenta com alta resolução taxonômica para ordem. Desta forma, este trabalho tem como objetivo descrever o genoma mt de *Dendrophyllia arbuscula* que em trabalhos anteriores foi recuperada formando um clado com espécies do gênero *Rhizopsammia*, fornecendo assim informações sobre a classificação do gênero, bem como da família Dendrophylliidae. Adicionalmente, a monofilia da família foi testada através da reconstrução filogenética com base em todos os genes codificadores de proteínas do genoma mt. De forma geral, o genoma mt de *D. arbuscula* possui 19.088 pb, compreendendo 2 rDNAs (rrnL e rrnS), 2 tRNAs (trnM e trnW) e 13 genes codificantes de proteína (ND1-6; ND4L; ATP6; ATP8, COB; CO1-3), além de dois introns de grupo I interrompendo os genes CO1 e ND5. A composição do genoma mt é similar ao dos demais representantes da família, com maior teor de timina e menor de citosina, resultando em alta quantidade de (A+T) e de Fenilalanina (TTT). A reconstrução filogenética recuperou a monofilia de Dendrophylliidae com elevado suporte estatístico.

Palavras-chave: genoma mitocondrial, *Dendrophyllia arbuscula*, Dendrophylliidae, Scleractinia.



## ABSTRACT

Dendrophylliidae is one of the few monophyletic families within the Scleractinia order that have representatives in both, shallow and deep-waters and solitary and colonial species. However, molecular data suggests that the vast majority of the genera of the family is para or polyphyletic. Among these, *Dendrophyllia* does not have an autapomorphy distinguishing it from the remaining dendrophylliid genera. Moreover, the high morphological variability, plasticity, and probably homoplasy of their representatives are stumbling blocks for this genus classification. Thus, in recent years, molecular data have been used to better understand the systematic and evolutionary history of the group. Despite of the very slow evolutionary rate, the anthozoan mitochondrial (mt) genome has been used as a taxonomic tool especially to test orders and families monophyly and respective position. In order to add to the current knowledge on scleractinian systematics, the present chapter describes the mt genome of *Dendrophyllia arbuscula* and tests the monofily of the family based on all mt protein-coding genes. Overall, *D. arbuscula* mt genome has 19,088 bp, comprising 2 rDNAs (*rrnL* and *rrnS*), 2 tRNAs (*trnM* and *trnW*), 13 protein-coding genes (ND1-6; ND4L; ATP6; ATP8, COB; CO1-3), and two group I introns interrupting the ND5 and CO1 genes. Furthermore, its nucleotide composition is similar to that of other dendrophylliids, showing a compositional bias towards (A+T), resulting in a high phenylalanine (TTT) content.

Keywords: mitochondrial genome, *Dendrophyllia arbuscula*, Dendrophylliidae, Scleractinia.

## 1.1 INTRODUÇÃO

Sequências nucleotídicas pertencentes ao genoma mitocondrial (mt) são, de forma geral, considerados marcadores moleculares de alta resolução taxonômica para metazoários (Emblem *et al.*, 2011). Entretanto, o genoma mt dos Anthozoa é considerado incomum aos demais metozoários, uma vez que sua taxa de evolução é extremamente lenta (van Oppen *et al.*, 1999a; 1999b; Shearer *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). A classe Anthozoa, além de possuir genoma mt circular que os distingue dos Medusozoa (Bridge *et al.*, 1992), é incomum ao possuir apenas dois dos 22 tRNAs reportados no genoma mt de outros metazoários - trnM e trnW (Beagley *et al.*, 1998; van Oppen *et al.*, 2002), 2 grupos de introns I (Beagley *et al.*, 1998; van Oppen *et al.*, 2002; Fukami & Knowlton, 2005; Tseng *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2006; Fukami *et al.*, 2007), além de várias regiões não codificantes – conhecidas como espaçadores intergênicos (IGS) –, e códons de parada em todos os genes codificadores de proteínas (Pont-Kingdon *et al.*, 1995; Beagley *et al.*, 1998; van Oppen *et al.*, 1999a, 1999b, 2002; Fukami & Knowlton, 2005; Tseng *et al.*, 2005).

Os antozoários pertencentes à subclasse Hexacorallia possuem genoma mt entre 14-22 kb contendo o mesmo conjunto de genes codificadores de proteínas, RNAs ribossômicos e um intron I no gene ND5 (Shearer *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2006; Nielsen & Johansen, 2009; Emblem *et al.*, 2011). De forma geral, com exceção de apenas alguns exemplos, esses genes são arranjos de maneira específica para cada ordem de Hexacorallia (Emblem *et al.*, 2011). Entretanto, com o acréscimo de descrições de genomas mt de representantes de Scleractinia, novas organizações/arranjos desses genes estão sendo reportados (*Madrepora* [Lin *et al.*, 2012], *Lophelia pertusa* [Emblem *et al.*, 2011] e *Seriatopora* [Chen *et al.*, 2008b]), além de variação no tamanho do genoma mt e na quantidade de regiões não codificadoras de proteínas (Chen *et al.*, 2008a; Lin *et al.*, 2014).

Recentemente, estudos moleculares sugerem que a ordem Scleractinia é dividida em três clados: “Robusta”, “Complexa” e “Basal” (Romano & Palumbi, 1996; Romano & Cairns, 2000; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kitahara *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Stolarski *et al.*, 2011). Destas, o clado “Basal” compreendida pelas famílias

Gardineriidae e Micrabaciidae, ambas compostas por espécies exclusivamente solitárias, azooxanteladas e de águas profundas, é considerada como a linhagem ancestral dentre os escleractíneos Recentes (Kitahara *et al.*, 2010; Stolarski *et al.*, 2011). Apesar de que ainda não foram encontradas diferenças morfológicas que suportem estes clados, Romano & Palumbi (1996, 1997) sugerem que os corais pertencentes aos clados “Robusta” e “Complexa” podem ser morfológicamente distintos pela *robustez* do esqueleto e pelo método de reprodução. De maneira geral, os corais pertencentes ao clado “Robusta” (e.g.: *Lophelia pertusa*) secretam esqueleto relativamente mais sólido do que os pertencentes a classe “Complexa” (e.g.: *Astroides calycularis*), além de se reproduzirem assexuadamente por brotamento intratentacular, enquanto os representantes do clado “Complexa” se reproduzem assexuadamente por brotamento extratentacular. Molecularmente, os representantes dos clados supracitados podem ser diferenciados pelo comprimento do genoma mt (mais extenso no clado “Basal” [ $>20\text{kb}$ ], intermediário no clado “Complexa” [17-19.5kb] e reduzido no clado “Robusta” [14-18kb]). Em adição, os corais dos clados “Basal” e “Complexa” possuem um maior número de IGSs (14) do que os corais “Robusta” (9) (ver Chen *et al.*, 2008a; Kitahara *et al.*, 2014), além de possuírem menor concentração de (A+T) (Kitahara *et al.*, 2014). Adicionalmente, são verificadas diferenças no intron que interrompe o gene CO1 entre estas subordens, possivelmente devido a origens distintas deste intron (Lin *et al.*, 2011), e também a presença de um indel na subunidade longa do gene ribossômico (16S rDNA). Entretanto, devido à inconsistência na classificação morfológica (taxonomia clássica) causada pela escassez de caracteres morfológicos associados à elevada plasticidade fenotípica (Cairns, 2001; Forsman *et al.*, 2009), aliado a homoplasia e homologia dos mesmos, a maioria das famílias de Scleractinia compostas predominantemente de espécies zooxanteladas são recuperadas com a utilização de dados moleculares, como polifiléticas (e.g.: Astrocoeniidae, Siderastreidae, Mussidae, Faviidae, Meandrinidae, etc.), possuindo representantes em ambas os clados “Robusta” e “Complexa” (Fukami *et al.*, 2004; 2008; Kitahara *et al.*, 2010).

De modo geral, a taxa de evolução extremamente lenta do mtDNA dos corais escleractíneos (Shearer *et al.*, 2002; Fukami & Knowlton, 2005; Medina *et al.*, 2006; Fukami *et al.*, 2008; Kitahara *et al.*, 2014) pode estar relacionando com a presença de um gene que codifica um componente do sistema de reparação de emparelhamentos incorretos de nucleotídeos (MSH1) (Van Oppen *et al.*, 1999b;

2002 Shearer *et al.*, 2002), induzidos geralmente por oxidação, radiação UV e agentes alquilantes (Raoult *et al.*, 2004). Destaca-se que este gene já foi reportado para o genoma mt de vários representantes da sub-classe Octocorallia (Beagley *et al.*, 1998; Pont-Kingdon *et al.*, 1998; Malik & Henikoff, 2000; Brugler & France, 2008). A homologia encontrada na proteína (MutS) transcrita por este gene, entre os octocorais e os vírus marinhos “gigantes” (i.e.: com longo DNA), sugere que os octocorais provavelmente adquiriram este gene por transferência horizontal através da transmissão por infecção viral ou ainda por associação endossimbiótica com Epsilonproteobacteria (Bilewitch & Degnan, 2011; Ogata *et al.*, 2011). Contudo, esta transferência provavelmente ocorreu após a divergência de Octocorallia e Hexacorallia (Bilewitch & Degnan, 2011), pois além deste gene ainda não ter sido identificado em corais escleractíneos ou outro representante de Hexacorallia, sequências nucleotídicas do genoma mt de corais do clado "Robusta" possuem elevada concentração de (A+T), além de um alto teor de fenilalanina nas proteínas que eles codificam, sugerindo assim uma falha no reparo do mtDNA nesta linhagem de Scleractinia (Kitahara *et al.*, 2014). Entretanto, segundo Ogata *et al.* (2011), a função da proteína MutS pode estar de alguma maneira associada à alta riqueza de (A+T) no genoma do hospedeiro.

Embora o genoma mt dos corais escleractíneos seja conservado e com baixa taxa evolutiva, estudos com base nos marcadores moleculares mitocondriais CO1, 16S, 12S, COB e IGS (Romano & Palumbi, 1996; van Oppen *et al.*, 1999b; Fukami *et al.*, 2004, 2007, 2008; Kitahara *et al.*, 2010), bem como nos genomas mt completos de representantes da ordem (van Oppen *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2005; Brugler & France, 2007; Emblem *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2014) têm sido desenvolvidos para a análises de relações à nível específico e de populações. Adicionalmente, estudos com base em sequências nucleotídicas mitocondriais têm sido bem sucedidos em reconstruções filogenéticas e da história evolutiva da ordem (ver Lin *et al.*, 2011; Kitahara *et al.*, 2014) e de famílias (e.g.: Acroporidae [Fukami *et al.*, 2000]; Dendrophylliidae [ver cap. 2; Arrigoni *et al.*, 2014]).

Mesmo com alta variabilidade morfológica e ecológica, tendo representantes coloniais, quasicoloniais e solitários, fixos ou de vida livre, além de zooxantelados, azooxantelados ou com simbiose facultativa (Cairns, 2001), Dendrophylliidae é uma das poucas famílias de Scleractinia com representantes em águas rasas considerada monofilética (Cairns, 2001; Kitahara *et al.*, 2010; Arrigoni *et al.*, 2014;

ver cap. 2). Ponderada como a terceira entre todas as famílias de corais do Holoceno com maior riqueza de espécies (12%) e a quarta com a maior número de gêneros (Cairns, 2001), os corais dendrofilídeos compreende em sua totalidade 29 gêneros e 364 espécies, dos quais 20 gêneros e 166 espécies são recentes (Cairns, 1999; 2001; 2007; Daly *et al.*, 2007). A alta riqueza de espécies e variedade morfológica dos dendrofilídeos é acompanhada por uma ampla distribuição destes organismos, uma vez que ocorrem globalmente, em uma grande variedade de ambientes do infralitoral a 2.165 m de profundidade, além de serem registrados em cavernas submarinas (Cairns, 2001; Lam *et al.*, 2008). Entretanto, alguns dos tradicionais gêneros da família são recuperados em filogenias moleculares como para ou polifiléticos (Arrigoni *et al.*, 2014; ver cap. 2).

Os dendrofilídeos pertencentes ao gênero *Dendrophyllia* são coloniais e apresentam alta variabilidade morfológica do coralito e do coralum (Filkorn & Alor, 2004). De acordo com Cairns (1994; 2001) representantes deste gênero podem ser agrupados de acordo com suas respectivas formas de crescimento por brotamento extratentacular: i) colônias arborescentes com grandes coralitos axiais; ii) colônias espessas, com pequenos coralitos e poucas ramificações no ramo principal; e iii) colônias com ramificação dendróide simpodial, sem coralitos. Assim com na família Dendrophylliidae, a alta variabilidade morfológica do gênero é seguida por uma ampla diversidade de habitats em que ocorrem, sendo registradas em águas rasas e profundas (1-900 m) de regiões tropicais e temperadas (Cairns, 2001). Análises filogenéticas com base em marcadores moleculares recuperaram o gênero como polifilético, e com agrupamento de seus representantes com espécies de diferentes características morfológicas e ecológicas pertencentes a outros gêneros (Arrigoni *et al.*, 2014; ver cap. 2). Uma das hipóteses para isso é a homoplasia de *Dendrophyllia* (ver cap. 2), e a falta de caracteres morfológicos para a sua classificação, uma vez que os representantes deste gênero não apresentam um caractere morfológico autapomórfico, e sim a combinação de vários caracteres (Cairns, 2001). A dendrofilia de água rasa *D. arbuscula*, além de ser morfológicamente semelhante aos representantes do gênero *Rhizopsammia*, possuindo número de septos reduzidos, os quais são organizados em quatro ciclos, sendo os dois primeiros projetantes (Sentoku & Ezaki, 2012; Arrigoni *et al.*, 2014), foi recuperada em análises filogenéticas com base em marcadores moleculares mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e nuclear (28S) formando um clado com alto valor de suporte com

*Rhizopsammia verrilli* (água rasa e profunda), *R. wettsteini* (água rasa) e outra espécie de *Rhizopsammia* não identificada a nível específico (V291) (ver cap. 2).

De forma geral, apesar da importância da família Dendrophylliidae, as relações filogenéticas de seus representantes ainda não são bem compreendidas. Adicionalmente, apesar de análises do genoma mt serem consideradas como excelentes ferramentas para resolver relações filogenéticas, ao fornecer informações quali/quantitativas, até o presente poucas sequências completas de genomas mt de representantes da família são conhecidas, a saber: três disponíveis no GenBank (*Turbinaria peltata* [Shi *et al.*, 2014], *Tubastraea coccinea* e *Dendrophyllia cribrosa* e [Kwak *et al.*, 2011; *in press*]), e outras duas sequências pertencentes a *Tubastraea* já sequenciadas mas ainda não publicadas (*T. coccinea* e *T. tagusensis* – Capel, K. C. C., comunicação pessoal). Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi determinar o genoma mt de *D. arbuscula* (Figura 1) fornecendo assim informações relacionados não apenas à sua classificação, mas também à evolução do gênero, bem como da família Dendrophylliidae.

## 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.2.1 MATERIAL: LOCALIZAÇÃO E PRESERVAÇÃO

Espécimes de *Dendrophyllia arbuscula* (Figura 1b) foram coletadas na Baía de Seto, Shirahama, Japão ( $33^{\circ}41'25''\text{N}$  e  $135^{\circ}20'16''\text{E}$ ), no dia 13 de julho de 2013, a aproximadamente 10 m de profundidade (Figura 1a). Após a coleta o material foi mantido em catifeiro e posteriormente preservado em etanol 99%.

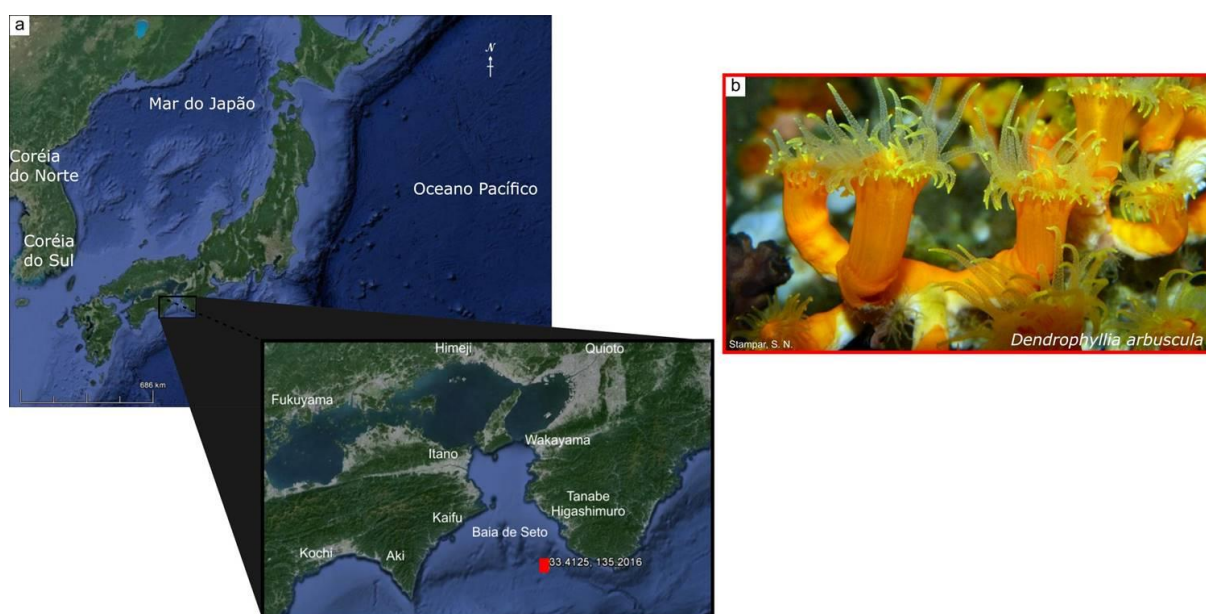


Figura 1: Foto da colônia de *Dendrophyllia arbuscula* coletada na Baía de Seto, Shirahama, Japão, e utilizada para a extração do DNA genômico total.

### 1.2.2 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA

Para a extração do DNA genômico total de *Dendrophyllia arbuscula*, uma amostra de seu mesentério foi retirado com auxílio de uma pinça e submergido na solução tampão de lise. A extração foi realizada usando o *DNeasy Tissue Kit* (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante e sua concentração final foi mensurada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A qualidade do DNA genômico extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%). Posteriormente, porções de todos os genes mitocondriais de rDNA e

dos codificadores de proteínas foram amplificados pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando a *TopTaq polymerase master mix kit* (Quiagen), seguindo as instruções dos fabricantes, além dos iniciadores universais de Scleractinia do clado “Complexa” (CS-1 ao CS-21) e suas respectivas condições (Lin *et al.*, 2011). Para cobrir as regiões do genoma mt não contempladas pelos iniciadores universais, foram desenvolvido 5 iniciadores (Tabela 1) com base em sequências de *D. arbuscula* e *Balanophyllia gigas*. Os amplicons resultantes dos PCRs variaram de ~500 a 1500 pb dependendo do iniciador, e após validados por eletroforese em gel de agarose (1%), foram enviados para sequenciamento direto na MacroGen (Coréia).

Tabela 1: Descrição dos primers e sequências projetados para a amplificação das sequências do genoma mitocondrial não contempladas pelos primers universais (Lin *et al.*, 2011)

Iniciador <i>forward</i>	Sequência (5' ao 3')	Iniciador reverso
Dendro46JpF17	TTTTATTGGCTTTTACTTTG	CS-18R
2.5Bgigas/2F	CTACCAAGACACCATTCAAC	CS-3R
5.5Bgigas/2F	GGGGCTATTGCTATTTTATT	CS-6R
19.5Bgigas/2F	GTGGCTAAAAATTGAACTGA	CS-20R
20.5Bgigas/2F	GAGCAGGCACTTACTTTTTA	CS-21R

### 1.2.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas foram verificadas e manipuladas utilizando o *software* Sequencher v. 5.1 (Gene Codes) e depois de editadas foram validadas através do *Blast search* do GenBank. Observação dos “*Open Reading Frames*” (ORFs) e códons usados, bem como as análises estatísticas relacionadas ao mtDNA foram realizadas no Dual Organelle Genome Annotator (Wyman *et al.*, 2004) e no *software* MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). A sequência do genoma mt completo de *Dendrophyllia arbuscula* foi comparada com a das *Tubastraea* (Capel *et al.*, dados não publicados) e com os três genomas mt disponíveis no Genbank pertencentes a representantes da família Dendrophylliidae e de outros cnidários (Tabela 2).



#### 1.2.4 RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

Sequências de 13 genes codificadores de proteínas de *Dendrophyllia arbuscula* obtidas pela técnica de PCR em conjunto com o mesmo *set* de genes oriundos de 65 espécies (49 escleractíneos [6 dendrofilídeos], 2 actiniários, 1 antipatária, 11 coralimorfários e 2 octororais [Tabela 2]) com sequências disponíveis no GenBank, foram alinhadas com a utilização do software ClustalX 2.1 (Larkin et al., 2007). O alinhamento resultante foi verificado e editado no *software* GeneDoc 2.7 (Nicholas et al., 1997), e a reconstrução filogenética foi realizada pela análise de Máxima Verossimilhança utilizando o programa PhyML (Guindon et al., 2010; <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>) e o modelo evolutivo GTR+G+I (Tavaré, 1986), o qual foi recuperado como o que melhor descreve a substituição de nucleotídeos (lnL - 140439.720), através do *software* MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). A topologia resultante foi avaliada pelos valores de suporte estatísticos calculados com base em 100 réplicas de bootstrap e também com sh-like.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1.3.1 ORGANIZAÇÃO E CONTEÚDO GENÉTICO

As características do genoma mt de *Dendrophyllia arbuscula* são similares ao do seu congênere (*D. cribrosa*) e dos dendrofilídeos pertencentes aos gêneros *Tubastraea* (*T. coccinea* e *T. tagusensis*) e *Tubinaria* (*T. peltata*), além de suportarem a classificação da espécie no clado “Complexa” e a proximidade da família com Poritidae (Medina et al., 2006; Lin et al., 2011; Shi et al., 2014; Kwak et al. [submetido]). De forma geral, os escleractíneos pertencentes ao clado “Basal” possuem genoma mt longo (>19.4 kb), enquanto os corais “Robusta” possuem as menores extensões (14 – 17 kb) e os pertencentes ao clado “Complexa” apresentam tamanho intermediário (Lin et al., 2011; Kitahara et al., 2014). Com 19.088 pb, o genoma mt de *D. arbuscula* (Tabela 2) é um pouco menor do que o registrado para *Tubastraea* spp. (19.094 pb) e *Pseudosiderastrea* spp. (19.475 pb [Chuang & Chen, 2015]), mas relativamente maior se comparado com o de sua congênere *D. cribrosa* (19.072) e da *Tubinaria* (18.966), bem como o de outros representantes das outras

famílias pertencentes ao clado “Complexa” (e.g.: *Montipora cactus* – 17.888 pb; *Acropora tenuis* – 18.338 pb; *Anacropora matthai* – 17.887 pb; *Porites porites* – 18,648 bp; *Agaricia humilis* – 18.735, ver Tseng *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011) e as pertencente ao clado “Robusta” (e.g.: *Astrangia* sp. – 14.853 pb; *Polycyathus* sp. – 15.357 pb; *Madracis mirabilis* – 16.951 pb, ver Medina *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011). Assim, o tamanho do genoma mt de representantes da família Dendrophylliidae, além de ser um dos mais extensos se comparados a de outros Scleractinia, é consistente com a divergência relativamente antiga da família (~130Ma), como recuperado em filogenias da ordem (Romano & Palumbi, 1996; Veron *et al.*, 1996; Romano & Cairns, 2000; Cairns, 2001; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kerr, 2005; Kitahara *et al.*, 2010).

Tabela 2: Dados dos genomas mitocondriais utilizados na análise filogenética por Máxima Verossimilhança.

Ordem	Espécie	Tamanho	Código GenBank	Referência
Actiniaria				
	<i>Metridium senile</i>	17.443	NC000933	Beagley <i>et al.</i> , 1998
	<i>Nematostella</i> sp	16.389	DQ643835	Medina <i>et al.</i> , 2006
Alcyonacea				
	<i>Briareum asbestinum</i>	18.632	DQ640649	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	18.733	DQ640646	Medina <i>et al.</i> , 2006
Antipatharia				
	<i>Chrysopathes formosa</i>	18.398	NC008411	Brugler & France, 2007
Corallimorpharia				
	<i>Actinodiscus nummiformis</i>	20.922		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Amplexidiscus fenestrafer</i>	20.188		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Corallimorphus profundus</i>	20.488		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Corynactis californica</i>	20.632		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Discosoma</i> sp.1	20.908	DQ643965	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Discosoma</i> sp.2	20.912	DQ643966	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Rhodactis indosinesis</i>	20.092		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Rhodactis mussoides</i>	20.826		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Rhodactis</i> sp.	20.093	DQ640647	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Ricordea florida</i>	21.376	DQ640648	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Ricordea yuma</i>	22.015		Lin <i>et al.</i> , 2014
Scleractinia				
	<i>Acropora aspera</i>	18.479	KF448532	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora digitifera</i>	18.479	KF448535	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora florida</i>	18.365	KF448533	Chan & Chen (submetido)

Ordem	Espécie	Tamanho	Código GenBank	Referência
	<i>Acropora hyacinthus</i>	18.566	KF448531	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora humilis</i>	18.479	KF448528	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora horrida</i>	18.48	KF448530	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora muricata</i>	18.481	KF448529	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora nasuta</i>	18.481	KF448536	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora robusta</i>	18.48	KF448538	Chan & Chen (submetido)
	<i>Acropora tenuis</i>	18.338	AF338425	van Oppen <i>et al.</i> , 2002
	<i>Acropora yongei</i>	18.342	KF448534	Chan & Chen (submetido)
	<i>Agaricia fragilis</i>	18.667	KM051016	Wares, 2014
	<i>Agaricia humilis</i>	18.735	DQ643831	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Anacropora matthai</i>	17.888	AY903295	Tseng <i>et al.</i> , 2005
	<i>Alveopora</i> sp.	18.146	KJ634271	Kitahara <i>et al.</i> , 2014
	<i>Astrangia</i> sp.	14.853*	DQ643832	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Astreopora explanata</i>	18.106	KJ634269	Kitahara <i>et al.</i> , 2014
	<i>Astreopora myriophthalma</i>	18.106	KJ634272	Kitahara <i>et al.</i> , 2014
	<i>Colpophyllia natans</i>	16.906*	DQ643833	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Dendrophyllia arbuscula</i>	19.088		Presente estudo
	<i>Euphyllia ancora</i>	18.875	JF825139	Lin <i>et al.</i> , 2011
	<i>Fungiacyathus stephanus</i>	19.381	JF825138	Lin <i>et al.</i> , 2011
	<i>Gardineria hawaiiensis</i>	19.429**		Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>Goniopora columna</i>	18.766	JF825141	Lin <i>et al.</i> , 2011
	<i>Isopora palifera</i>	18.725	KJ634270	Kitahara <i>et al.</i> , 2014
	<i>Isopora togianensis</i>	18.637	KJ634268	Kitahara <i>et al.</i> , 2014
	<i>Lophelia pertusa</i>	16.149*	KC875349	Flot <i>et al.</i> , 2013
	<i>Madrepora oculata</i>	15.841*	JX236041	Lin <i>et al.</i> , 2012
	<i>Montastraea faveolata</i>	16.138*	AP008978	Fukami & Knowlton, 2005
	<i>Madracis mirabilis</i>	16.951*	EU400212	Chen <i>et al.</i> , 2008b
	<i>Montastraea annularis</i>	16.138*	AP008974	Fukami & Knowlton, 2005
	<i>Montastraea franksi</i>	16.137*	AP008976	Fukami & Knowlton, 2005
	<i>Montipora cactus</i>	17.887*	AY903296	Tseng <i>et al.</i> , 2005
	<i>Mussa angulosa</i>	17.245*	DQ643834	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pavona clavus</i>	18.315	DQ643836	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pocillopora damicornis</i>	17.425*	EU400213	Chen <i>et al.</i> , 2008b
	<i>Pocillopora eydouxi</i>	17.422*	EF526303	Flot & Tillier, 2007
	<i>Polycyathus</i> sp.	15.357*	JF825140	Lin <i>et al.</i> , 2011
	<i>Porites okinawensis</i>	18.647	JF825142	Lin <i>et al.</i> , 2011
	<i>Porites panamensis</i>	18.628	KJ546638	Del Río-Portilla <i>et al.</i> , 2014
	<i>Porites porites</i>	18.648	DQ643837	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Seriatopora hystrix</i>	17.059*	EF633600	Chen <i>et al.</i> , 2008b
	<i>Seriatopora caliendrum</i>	17.010*	EF633601	Chen <i>et al.</i> , 2008a
	<i>Siderastrea radians</i>	19.387	DQ643838	Medina <i>et al.</i> , 2006
	<i>Tubastraea coccinea</i>	19.070	JQ290078	Kwak <i>et al.</i> (submetido)
	<i>Tubastraea coccinea</i>	19.094		Capel, K. C. C., comunicação pessoal

Ordem	Espécie	Tamanho	Código GenBank	Referência
	<i>Tubastraea tagusensis</i>	19.094		Capel, K. C. C., comunicação pessoal
	<i>Turbinaria peltata</i>	18.966	KJ725201	Shi <i>et al.</i> , 2014

\*\* indica os representantes do clado “Basal” e \* indica os corais pertencentes ao clado “Robusta”. Os corais escleractíneos sem marcação pertencem ao clado “Complexa”

O genoma mt de *D. arbuscula* é composto por 2 rDNAs, 2 tRNAs e 13 genes codificantes de proteína, todos transcritos na mesma fita (Figura 2), sendo assim, similar a outros corais escleractíneos (Shearer *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008a; Del Río-Portilla *et al.*, 2014; Kitahara *et al.*, 2014) e sugerindo que esta é uma condição plesiomórfica da ordem (Medina *et al.*, 2006). Dos 13 genes codificadores de proteínas, 7 codificam NADH *dehydrogenase subunits* (ND1-6 e ND4L), 2 codificam as subunidades 6 e 8 do ATP *synthase* (ATP6 e ATP8), 1 codifica o *cytochrome b* (COB), e 3 codificam as subunidades do *cytochrome oxidase* (CO1-3). Os genes que codificam os RNAs de transferência são associados com metionina (trnM) e triptofano (trnW) e, como verificado em *Tubastraea* (Capel, K. C. C. – comunicação pessoal), a subunidade pequena (*rns*) e grande (*rnl*) do gene ribossomal localizam-se em lados opostos do genoma. Adicionalmente, o genoma mt de *D. arbuscula* possui 18 IGSs e o CO1 e ND5 são interrompidos por introns do grupo I, da mesma forma como observado em outros Hexacorallia (Medina *et al.*, 2006).

Introns do grupo I são ribozimas com estrutura conservada que interrompem genes funcionais. Estes podem ser transcritos pelo mRNA, mas são removidos pelos RNAs spliceomais, embora muitas vezes são capazes de catalisar sua própria excisão. Herdados vertical ou horizontalmente (Nielsen & Johansen, 2009), os introns do grupo I possuem organização complexa, podendo incorporar genes funcionais e outros elementos (Goddard & Burt, 1999), muitas vezes adquirindo novas funções biológicas (Goddard & Burt, 1999; Nielsen & Johansen, 2009). Em *D. arbuscula*, o intron que interrompe o ND5 possui extensão de 11.301 pb e engloba 11 genes, dos quais 10 codificam proteínas (ND1-4, 6 e 4L, COB, ATP6 e COX2-3) e 1 codifica rDNA. Apesar do grande tamanho deste intron, o gene ND5 é funcional (van Oppen *et al.*, 2002). A “composição” do intron ND5 é a mesma verificada para outros Hexacorallia (Medina *et al.*, 2006), entretanto, sua extensão é similar aos dos demais corais escleractíneos (e.g. *A. tenuis* – ~11.928 pb [van Oppen *et al.*, 2002];

*Montastraea annularis* – 9.561 pb [Fukami & Knowlton, 2005]; *Montipora cactus* – 11.486 pb; *Anacropora matthai* – 11.493 pb [Tseng *et al.*, 2005]; *Madracis mirabilis* – 10.416 pb; *Stylophora pistillata* – 10.584 pb; *Pacillopora damicornis* 10.864 pb [Flot & Tillier, 2007; Chen, *et al.*, 2008b]; *P. eydouxii* 10.864 pb [Flot & Tillier, 2007]; *Pseudosiderastrea formosa*; *Seriatopora caliendrum* – 10.171 pb; *S. hystrix* – 10.199 [Chen, *et al.*, 2008b]; *Lophelia pertusa* – 6.460 pb [Emblem *et al.*, 2011]; *P. tayamai* – 11.524 pb [Chuang & Chen, 2015]), e intermediária se comparada com Corallimorpharia (e.g.: *Rhodactis* sp. – 20.093 pb; *Discosoma* sp. – 20.912 pb; *Ricordea florida* – 21.376 pb [Medina *et al.*, 2006]) e Actiniaria (e.g.: *Metridium senile* – 17.443 pb [Beagley *et al.*, 1998]; *Nematostella* sp. – 16.389 pb [Medina *et al.*, 2006]). Isso sugere que este intron, além de provavelmente ter sido adquirido pelos hexacorais, tem a tendência de englobar os demais genes do genoma mt, aumentando assim seu tamanho (Medina *et al.*, 2006). Em contrapartida, o intron que divide o CO1 é menor (894 pb) e não engloba nenhum gene.

A composição do intron do grupo I que divide o gene ND5 dos representantes de Hexacorallia sugere que este provavelmente foi herdado verticalmente (Emblem *et al.*, 2011), e apresenta dois subtipos: i) um mais compactado com sobreposição de ribozimas e capacidade de codificar proteínas, presente no coral do clado “Robusta” *Lophelia pertusa*; e ii) outro com estrutura maior, encontrado em corais do clado “Complexa” como por exemplo *Acropora tenuis* (Emblem *et al.*, 2011) e *D. arbuscula*. Em contraste, a baixa similaridade entre o intron localizado no gene CO1 dos corais escleractíneos “robustos” e “complexos” sugere que estes o adquiriram de diferentes táxons invasores (Lin *et al.*, 2011), ou alternativamente, pode ter ocorrido uma inserção, seguida de múltiplas perdas (Fukami *et al.*, 2007). No primeiro caso, considera-se que o intron do CO1 dos corais “robustos” se originou provavelmente da invasão de um Porífera (Fukami *et al.*, 2007).

De maneira geral, os introns e IGSs presentes no genoma mt dos dendrofilídeos, embora apresentem características típicas de corais “complexos” (Lin *et al.*, 2011), são de tamanhos diferentes entre os gêneros da família. O intron do ND5 de *D. arbuscula* é ligeiramente maior do que de seu congênere *D. cribrosa* (18 pb) e menor do que das *Tubastraea* (22 pb) e *Turbinaria peltata* (32 pb). O intron do CO1 é ligeiramente menor do que os demais gêneros da família (8 pb). Em contraste, os IGSs do genoma mt de *D. arbuscula*, além de serem mais extensos, compreendem uma parcela maior do genoma mt (3.651 pb – 19.12%) do que o

observado nas demais espécies da família (*D. cribrosa* [3.300 pb – 17.35%], *Tubastraea* [2.404-3.333 pb – 12.6-17.48%] e *T. peltata* [3.408 pb – 17.97%]).

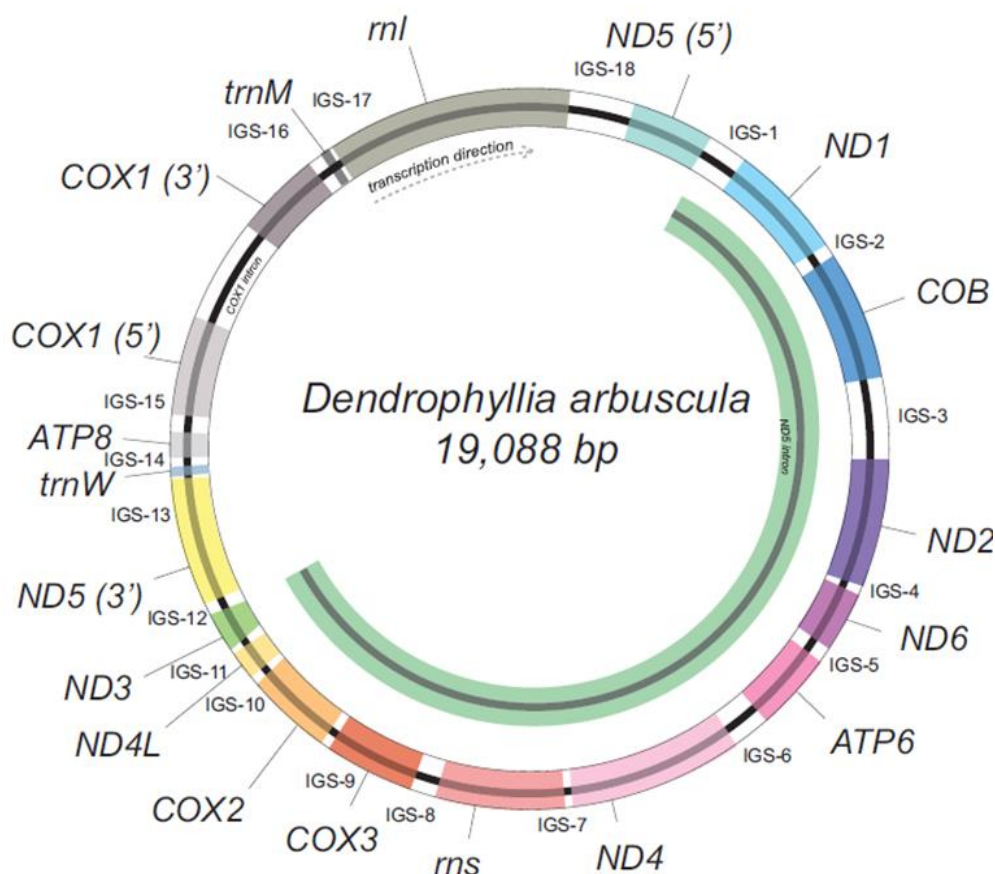


Figura 2: Mapa do genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula*. Linha pontilhada indica a direção da transcrição. Os genes codificadores de proteína, tRNAs e rDNAs estão abreviados conforme no texto. Regiões em branco representam os espaços intergênicos, com exceção da região entre o COX1 que corresponde ao intron deste gene. O círculo interno destacado em verde indica o intron do ND5.

A composição nucleotídica do genoma mt de *D. arbuscula* é similar a dos demais dendrofilídeos, possuindo maior teor de timina e menor de citosina (37.3% T, 25.4% A, 23.7% G e 13.7% C). Em adição, assim como verificado em *Acropora tenuis* (van Oppen *et al.*, 2002), os genes que possuem maiores e menores porcentagens de (A+T) são o ND4L (69,23%) e o *trnM* (43,66%) respectivamente (Tabela 3). De forma geral, o teor de (A+T) observado em *D. arbuscula* (62.8%) é relativamente similar a dos demais metazoários (Beaton *et al.*, 1998), estando assim dentro do esperado para os corais escleractíneos pertencentes ao clado “Complexa” (e.g.: 62,1% em *A. tenuis* [van Oppen *et al.*, 2002]; 61,6% em *Montipora cactus* e *Anacropora matthai* [Tseng *et al.*, 2005]; e 62,7% em *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* [Capel, K. C. C., comunicação pessoal]). Entretanto, o genoma mt dos

representantes do clado “Robusta” possuem de 5 à 6% mais (A+T) do que o dos corais do clado “Complexa” (Kitahara *et al.*, 2014) (e.g.: 66% em *Montastraea* spp. [Fukami & Knowlton, 2005]; 70.2% em *Pocillopora damicornis* [Chen, *et al.*, 2008b]; 68.3% em *Astrangia* sp. [Medina *et al.*, 2006]; 69.46% em *Madrepora oculata* [Lin *et al.*, 2012]). Estas diferenças composicionais do genoma mt de representantes dos clados “Complexa” e “Robusta” pode ser causada pela linhagem dos corais “robustos” estar evoluindo mais rapidamente do que os “complexos” (Chen *et al.*, 2002; Fukami & Knowlton, 2005), devido possivelmente ao ineficiente processo de reparação do DNA mt destes corais (Kitahara *et al.*, 2014).

Tabela 3: Organização do genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula*.

Região do gene	Posição	Comprimento (pb)	A+T (%)	Códon inicial/final	IGS*
rrnL (3')	1 - 507	506	62.65	/TAG	
nd5 (5')	911 - 1634	722	62.19	GTG/TAA	405 (IGS-1)
nd1	1963 - 2948	984	61.89	ATG/TAA	330 (IGS-2)
cob	3074 - 4213	1138	61.07	ATG/TAG	127 (IGS-3)
nd2	4877 - 5976	1098	62.57	ATG/TAA	665 (IGS-4)
nd6	6008 - 6603	594	64.98	ATA/TAA	33 (IGS-5)
atp6	6684 - 7384	699	63.81	ATG/TAG	82 (IGS-6)
nd4	7684 - 9161	1476	63.35	ATG/TAA	301 (IGS-7)
rrnS	9223- 10307	1083	59.28	GTC/TGA	63 (IGS-8)
cox3	10540 - 11330	789	62.10	ATG/TAG	234 (IGS-9)
cox2	11366 - 12111	744	63.44	ATG/TAG	37 (IGS-10)
nd4L	12163 - 12463	299	69.23	GTG/TAA	53 (IGS-11)
nd3	12483 – 12839	355	65.07	GTG/TAG	21 (IGS-12)
nd5 (3')	12934 – 14054	1119	62.73	CCA/TAG	96 (IGS-13)
trnW	14093 – 14170	76	52.63	AGG/TAA	40 (IGS-14)
atp8	14195 – 14412	216	68.52	ATG/TAA	26 (IGS-15)
cox1 (5')	14534 – 15437	902	60.20	ATG/TAG	123 (IGS-16)
cox1 (3')	16329 – 17077	747	61.85	GGG/TAA	893 (IGS-17)
trnM	17198 – 17270	71	43.66	TGT/CAG	122 (IGS-18)
rrnL (5')	17270 - 19047	1776	60.87	TTT/-	-

\* refere-se ao espaço intergênico (pb) entre-o gene da linha superior e inferior.

A relação dos aminoácidos traduzidos a partir da sequência nucleotídica do genoma mitocondrial de *D. arbuscula* é similar a de outros hexacorais (ver Kitahara *et al.*, 2014), sendo os mais comuns a Leucina (12.9%), Serina (10.7%) e a Fenilalanina (10.4%), enquanto os ácidos aspártico e glutâmico, e a histidina foram os menos frequentes, com 2.1%, 1.9% e 1.4%, respectivamente (Figura 3). Todos os

64 códons são utilizados, abarcando um total de 3.960 códons, dos quais o mais comum foi TTT (Fenilalanina) com 7.63% e os menos comuns foram CAC (Histidina) e CGC (Arginina) com 0.2% e 0.25%, respectivamente (Figura 4), sendo assim, similar ao verificado para *D. cribrosa*, *T. peltata* e *T. coccinea*. Entretanto, essas possuem uma concentração relativamente mais alta de Fenilalanina (~9.4%) e o códon CGC (Arginina) como o menos comum (0.2%). A alta frequência de TTT é observada também em outros representantes de Scleractinia (Chen *et al.*, 2008a), da mesma forma como a alta concentração do nucleotídeo T na posição terminal (Kitahara *et al.*, 2014). Assim, embora o nucleotídeo T na terceira posição do códon seja o mais frequente em *D. arbuscula* (40%), sua concentração é menor do que a observada em *Tubastraea* (41.8 - 44% em *T. coccinea* e 44% em *T. tagusensis*; ver Kwak *et al.* – *in press*; Capel, K. C. C. – comunicação pessoal), embora seja similar ao da sua congênere *D. cribrosa* (39.4%).e da *Turbinaria peltata* (40.5%).

Os códons de início e de parada do processo de transcrição dos genes codificadores de proteína de *D. arbuscula* são comuns aos demais anthozoários (Chuang & Chen, 2015). O códon inicial ATG (metionina) é o mais abundante, estando este presente em 9 dos 13 genes codificadores de proteína (Tabela 3). A transcrição do ND6 inicia com ATA (isoleucina) e ND5, ND3 e ND4L iniciam-se com GTG (valina). A utilização de GTG e ATA como códon inicial já foi documentado para outros escleractíneos (e.g.: *Acropora tenuis* [van Oppen *et al.*, 1999b; 2002]; *Pseudosiderastrea* [Chuang & Chen, 2015]). Em *D. arbuscula* o processo de transcrição dos genes encerra com os códons de parada TAA ou TAG (Tabela 3).

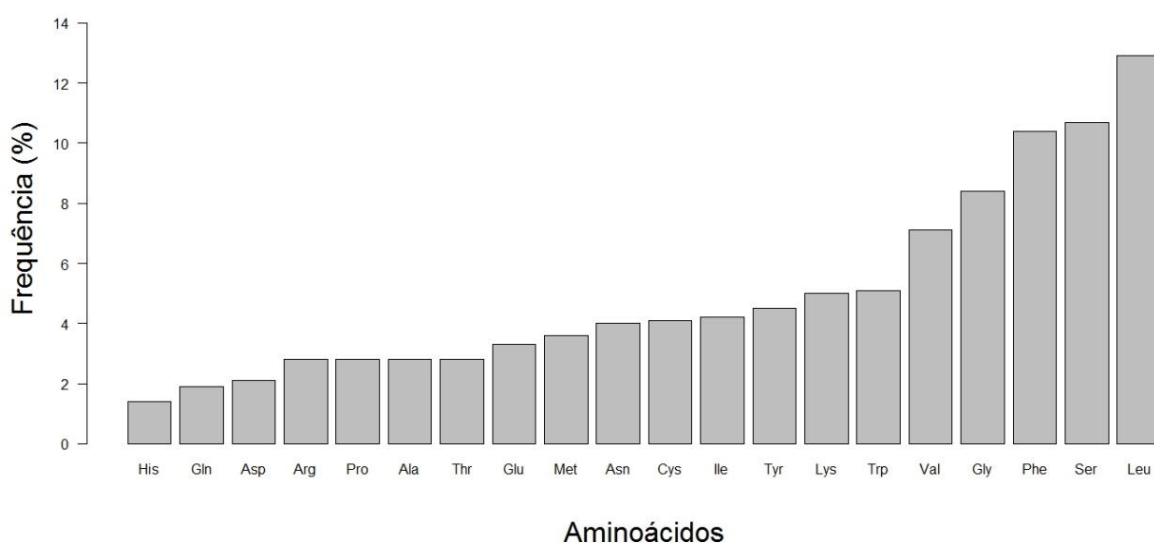


Figura 3: Frequência dos aminoácidos presentes no genoma mitocondrial de *Dendrophyllia arbuscula*.





bem compreendida, uma vez que estes diferem principalmente pelos representantes de Corallimorpharia não secretarem esqueleto calcário como os corais escleractíneos. Desta forma, uma das hipóteses evolutivas entre estas ordens é a perda da formação de esqueleto em um ancestral de Scleractinia, devido a acidificação dos oceanos, o qual teria dado origem à linhagem dos coralimorfários (Medina *et al.*, 2006). Entretanto, recentes análises do genoma mt de representantes destas ordens têm sugerido que saturação e elevada concentração de (A+T) possivelmente gera repulsão e ramos longos entre os clados “Complexa” e “Robusta” quando dados do genoma mt são utilizados na forma de aminoácido em reconstruções filogenéticas (Kitahara *et al.*, 2014). Desta forma, esta repulsão faz com que o clado “Complexa” seja recuperado como grupo irmão de Corallimorpharia.

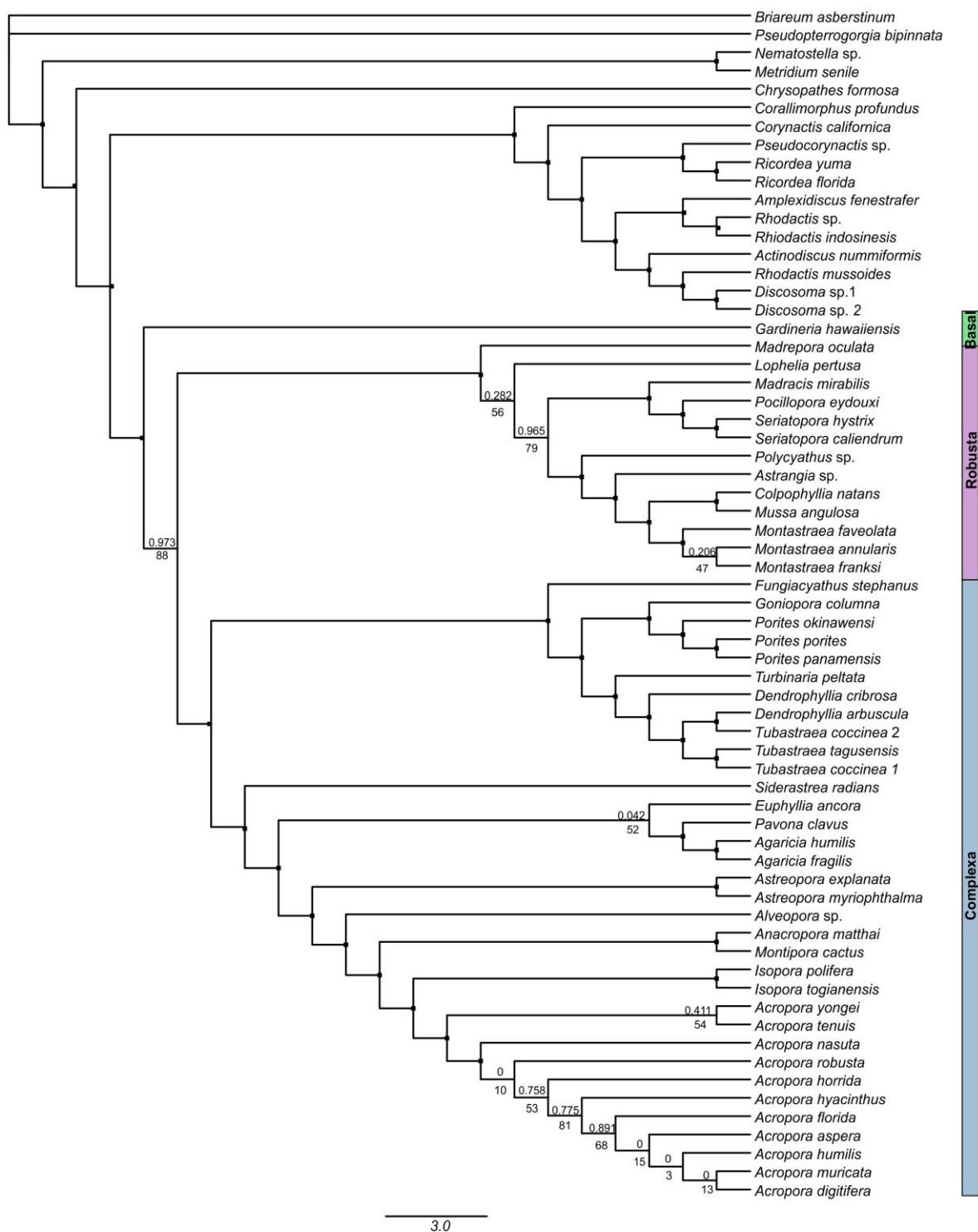


Figura 5: Reconstrução filogenética da classe Anthozoa. Topologia recuperada através da utilização das bases nucleotídicas dos genes codificadores de proteínas do genoma mt, baseada na análise Máxima Verossimilhança. Os números nos ramos indicam a suporte sh-like (acima) e valor de bootstrap (abaixo) calculados usando os programa PhyML. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like  $\geq 0,990$  e bootstrap  $\geq 90$ ). Os clados formados pelos escleractíneos “basal”, “robustos” e “complexos” são indicados pela barra, verde, roxo e azul, respectivamente.

## 1.4 CONCLUSÃO

Análises do genoma mt são ferramentas de alta resolução filogenética, além de serem importantes para estabelecer diferenças biológicas “mascaradas” em análises computacionais, como a semelhança entre Corallimorpharia e Scleractinia e a descendência entre representantes destes grupos. Desta forma, a monofilía da família Dendrophylliidae é bem suportada, uma vez que foi recuperada previamente com base em marcadores moleculares e morfológicos, e neste trabalho é corroborada com análises do genoma mt de *D. arbuscula* e outros representantes da família. Em adição, as análises do genoma mt suporta sua classificação no clado “Complexa” e sua proximidade com a família irmã Poritidae, além do comprimento do genoma mt de *D. arbuscula* estar de acordo com a origem relativamente antiga da família (~130 M.a.). Entretanto, a nível de gênero, as relações filogenéticas da família Dendrophylliidae ainda precisam ser investigadas, uma vez que a maioria dos gêneros são recuperados como para ou polifiléticos. Desta forma, apesar de avanços significativos terem sido conquistados nos últimos anos, ainda se fazem necessários mais estudos utilizando ferramenta moleculares em conjunto com dados morfológicos para resolver as relações internas dos dendrofilídeos.

## **CAPÍTULO 2: MUDANÇAS CLIMÁTICAS GLOBAIS E A EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA DENDROPHYLLIIDAE (CNIDARIA, SCLERACTINIA)**

---

*“Estuda o passado se queres prognosticar o futuro”*  
Confúncio

## RESUMO

Os cnidários da ordem Scleractinia são os principais formadores de recifes de corais de águas rasas (<50 m) e profundas (>100 m), os quais são caracterizados pela elevada diversidade e abundância de espécies, exercendo grande influência econômica e social. De forma geral, estes ecossistemas estão ameaçados devido principalmente as mudanças climáticas que estamos vivenciando. Entretanto, embora severamente ameaçados, os corais escleractíneos persistiram a inúmeras mudanças climáticas ao longo de sua história evolutiva, e acredita-se que adaptações e utilização de refúgios em águas mais profundas provavelmente auxiliaram na sobrevivência da ordem como linhagem. Estudos recentes indicam que os primeiros escleractíneos eram solitários, provavelmente azooxantelados e que “invadiram” águas profundas durante o Ordoviciano devido à instabilidade do ambiente raso somado à competição com outros antozoários. Das 24 famílias Recentes da ordem, Dendrophylliidae apresenta: i) elevada variedade morfológica; ii) representantes em ambientes rasos e profundos; e, conseqüentemente, iii) espécies zooxanteladas, azooxanteladas ou ainda com simbiose facultativa. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma reconstrução da história evolutiva dos corais dendrofilídeos utilizando marcadores moleculares mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e nuclear (28S rDNA) e, através da sua correlação com aspectos paleoambientais, identificar mudanças ambientais globais potencialmente responsáveis pelos eventos de divergência entre os clados recuperados, as quais posteriormente serviram para o desenvolvimento de hipóteses sobre o futuro desta família frente as mudanças climáticas globais contemporâneas. Análises de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana suportaram a monofilia da família, mas colocam em questão a validade da maioria dos gêneros. Em adição, os resultados do presente trabalho corroboram a hipótese de que o ancestral da família era provavelmente azooxantelado, solitário e habitava águas profundas, sendo a aquisição da simbiose com zooxantelas um fator facilitador para que representantes desta família explorassem e se estabelecessem em ambientes de águas rasas.

Palavras-chaves: Dendrophylliidae, Scleractinia, evolucao, paleoambientes, mudanças climáticas globais.

## ABSTRACT

Scleractinians are the main shallow (<50 m) and deep (> 100 m) water coral reefs builders. Known as highly biodiverse, coral reef ecosystems have great economic and social influence. Apart from direct impacts such overfishing, pollution, and eutrophication, these ecosystems are severely threatened by ongoing climate change. However, as a lineage, scleractinian corals have persisted to previous global climate change scenarios along its evolutionary history. One hypothesis put forward is that adaptation and use of deep-water refuges enable the survivorship of the group. Along with this hypothesis, it has been suggested that the first scleractinians were solitary, probably azooxanthelated, and "invaded" deep-water during the Ordovician as a result of shallow-water environment instability coupled with competition with others anthozoans. Of the 24 extant scleractinian families, the Dendrophylliidae is unique in having: i) high morphological variety; ii) representatives in shallow and deep environments; and iii) zooxanthellate, azooxanthellate, and facultative species. In order to add to the knowledge of how scleractinian corals might respond to ongoing climate change, to the present chapter aimed to reconstruct the evolutionary history of dendrophylliid corals using mitochondrial (CO1 and 16S rDNA) and nuclear (28S rDNA) markers. In addition, a fossil calibrated relaxed molecular clock was applied to correlate the evolutionary history of the family to paleo-environmental aspects. Maximum likelihood and Bayesian inference supported the Dendrophylliidae monophyly, but suggested that a major morphological revision must be undertaken in order to resolve the findings of polyphyly of most dendrophylliid genera. Furthermore, the present analyses corroborate the hypothesis that the family probably had an azooxanthellated, solitary ancestor that inhabited deep waters, and that the acquisition of symbiosis with zooxanthellae possibly facilitated the exploration and settlement of representatives of the family in shallow water environments.

**Keywords:** Dendrophylliidae, Scleractinia, evolution, paleoenvironments, global climate change.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os cnidários da ordem Scleractinia são os únicos entre as seis ordens de Hexacorallia (Cnidaria, Anthozoa) que secretam carbonato de cálcio na forma de aragonita, formando um esqueleto contínuo (Roberts *et al.*, 2009). Esta capacidade faz destes organismos os principais formadores de recifes de águas rasas (<50 m) e profundas (>100 m), os quais podem ser caracterizados pela complexidade tridimensional, fornecendo diversos habitats para outros organismos, sustentando assim, uma elevada diversidade e abundância de espécies (Stanley, 1981; Knowlton, 2001; Freiwald *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2006). Além disso, os ecossistemas recifais são considerados berços evolutivos e exportadores de diversidade para outros ambientes (Kiessling *et al.*, 2010).

Dentre as 24 famílias de corais escleractíneos com representantes Recentes, apenas Dendrophylliidae, Caryophylliidae e Oculinidae abarcam espécies construtoras de recifes e representantes que habitam águas rasas e profundas. Entre essas, a família Dendrophylliidae pode ser considerada como uma das mais variáveis ecologicamente, uma vez que além de apresentar variedade morfológica ímpar, tendo representantes fixos e de vida livre, coloniais, quasicoloniais e solitários, também abarca espécies zooxanteladas, azooxanteladas e com simbiose facultativa (Cairns, 2001). Os registros fósseis mais antigos de dendrofilídeos são reportados em extratos do Barremiano, Cretáceo (Figura 6), a cerca de 127 M.a. (Roberts *et al.*, 2009). Os representantes mais “primitivos” eram solitários, sendo o registro fóssil mais antigo, encontrado na Sérvia, pertencente ao gênero *Palaeopsammia* (Wanner, 1902). Apenas 27 M.a. depois, em extratos do Aptiano, temos o registro fóssil de um gênero colonial (*Blastozopsammia*) (Cairns, 2001; Filkorn & Alor, 2004). Subsequentemente, os dendrofilídeos passaram a apresentar uma grande variedade morfológica e tornaram-se comuns nos registros fósseis de várias partes do mundo (Figura 7a) (Cairns, 2001), como por exemplo: Paleoceno (e.g.: Espanha [Baceta *et al.*, 2005] e Antártica [Stolarski, 1996]); Eoceno (e.g. Eslovênia [Turnšek & Košir, 2004]); Oligoceno (e.g. França [Chaix & Cahuzac, 2001]); Mioceno (e.g. Brasil [Lalor & Távora, 2006]); limite entre Mioceno e Plioceno (e.g. Nova Zelândia [Hayward, 1977]); Plioceno (e.g. Egito [Kora & Abdel-fattah,



2000]); limite entre o Plioceno e Pleistoceno (e.g. Japão [Yabe & Sugiyama, 1935]); e Quaternário (e.g. Austrália [Pickett *et al.*, 1985]). Atualmente, representantes desta família mantêm ampla distribuição (Figura 7b), ocorrendo do infralitoral à 2.165 m de profundidade, mas sendo mais comumente reportados entre 50 e 300 m, além de também serem registrados em cavernas submarinas (Cairns, 2001; Lam *et al.*, 2008).

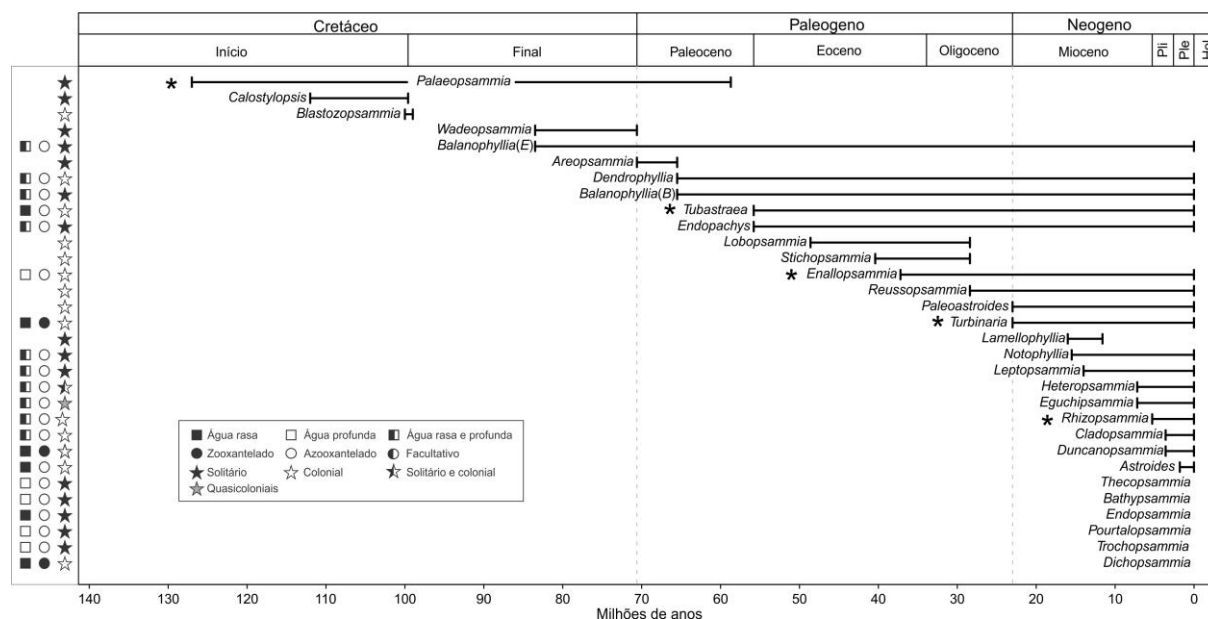


Figura 6: Período geológico de ocorrência dos gêneros extintos e de origem dos gêneros existentes (modificado de Cairns, 2001 e Filkorn & Alor 2004) de corais dendrofilídeos, onde asterisco (\*) marca os gêneros utilizados para a calibração da análise de relógio molecular. Os períodos "Pli, Ple e Hol" representam Plioceno, Pleistoceno e Holoceno, respectivamente.

A variedade morfológica e ecológica dos dendrofilídeos reflete também uma elevada riqueza de espécies e gêneros, sendo considerada a terceira família de corais escleractíneos do Holoceno em maior número de espécies (12%) e a quarta com a maior riqueza de gêneros (Cairns, 2001) - em sua totalidade compreende 29 gêneros e 364 espécies, dos quais 20 gêneros e 166 espécies são Recentes (Cairns, 1999, 2001, 2007; Daly *et al.*, 2007). A vasta maioria dos dendrofilídeos Recentes são azooxantelados (152 espécies) e, apenas três gêneros, compreendendo 14 espécies, são exclusivamente zooxantelados (*Turbinaria*, *Duncanopsammia* e *Astroides*). Em adição, de acordo com Cairns (2001) algumas espécies do gênero *Heteropsammia* possuem simbiose facultativa. Dos gêneros mais prolíficos - i.e. *Turbinaria*, *Balanophyllia* e *Dendrophyllia* - apenas *Turbinaria* é

zooxantelado (Veron *et al.*, 1996), apesar de alguns representantes de *Balanophyllia* também possuírem simbiose com dinoflagelados.

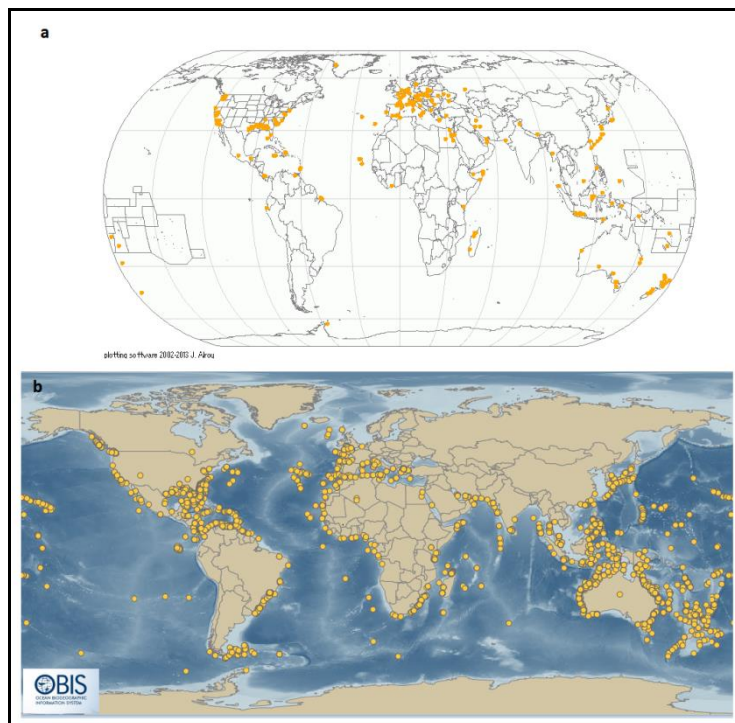


Figura 7: Distribuição de Dendrophylliidae. a) Registros fósseis datados desde o Cretáceo (ca. 150 M.a.) (fonte: <http://paleodb.science.mq.edu.au>) e b) atual (fonte: <http://iobis.org>).

Atualmente, a aplicação de técnicas moleculares sugere que a família pertence ao clado “Complexa” (Romano & Palumbi, 1996; Romano & Cairns, 2000; Kerr, 2005; Kitahara *et al.*, 2010) e é grupo irmão da família Poritidae (Romano & Palumbi, 1996; Romano & Cairns, 2000; Kerr, 2005; Fukami *et al.*, 2008; Kitahara *et al.*, 2010; Stolarski *et al.*, 2011). A monofilia de Dendrophylliidae foi recuperada com dados moleculares (Romano & Cairns, 2000; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kerr, 2005; Fukami *et al.*, 2008; Kitahara *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Arrigoni *et al.*, 2014), suportando assim caracteres macro-morfológicos únicos, como: parede synapticulotecada (parede porosa) e presença de cnidócito b-rhabdoids no filamento mesenterial (Cairns, 2001; Picciani *et al.*, 2011; Stolarski *et al.*, 2011). Microestruturalmente, representantes desta família também possuem: presença de depósitos de acreção rápidos (com cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro) organizados em grupos irregulares; além de fibras que engrossam o esqueleto arranjadas em pequenas manchas de alguns micrômetros de diâmetro (Cuif *et al.*, 2003; Arrigoni *et al.*, 2014).

As relações filogenéticas dos representantes da família Dendrophylliidae ainda são pouco conhecidas. Em uma revisão taxonômica dos gêneros dessa família, Cairns (2001) propõe uma reconstrução filogenética baseada em caracteres morfológicos, concluindo que o ancestral era provavelmente azooxantelado, solitário e que a simbiose foi adquirida independentemente três vezes ao longo da história evolutiva de seus representantes. Porém, utilizando dados moleculares (dois marcadores mitocondriais - CO1 e a região entre este e o 16S rDNA - e um marcador nuclear - ITS1, 5.8S e ITS2, e uma porção de 18S e 28S rDNAs) para 11 gêneros, englobando 30 espécies, Arrigoni *et al.* (2014) sugerem que dois principais clados são considerados basais, um composto pelos gêneros *Eguchipsammia*, *Cladopsammia* e *Heteropsammia*, e o outro formado pelas espécies de *Turbinaria*, com exceção de *T. peltata*. Nesta topologia foram propostas três reversões independentes do estado colonial para o solitário ao longo da história evolutiva da família e que o ancestral direto de Dendrophylliidae era provavelmente zooxantelado e, posteriormente, perderam, na maioria dos clados, esta simbiose e a dependência de ocorrência em locais fóticos. Outros estudos filogenéticos que incluem corais dendrofilídeos possuem escasso número de gêneros/espécies, com abordagem voltada a um melhor entendimento da ordem (Romano & Palumbi, 1996; Veron *et al.*, 1996; Romano & Cairns, 2000; Cairns, 2001; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Kerr, 2005; Kitahara *et al.*, 2010). Espécies de ambientes profundos, que compreendem a maior parte da família (91%), foram pouco representados nesses estudos.

Apesar da grande variedade morfológica e ecológica dos dendrofilídeos, pouco se conhece sobre a sua história evolutiva e os fatores ambientais/ecológicos responsáveis pelos processos evolutivos e de migrações entre ambientes de diferentes profundidades. Desta forma, o futuro não apenas dos corais dendrofilídeos, mas de toda a ordem é incerto frente aos efeitos de pressões antrópica, como sobrepesca, eutrofização e assoreamento (Knowlton, 2001; Hughes *et al.*, 2003; Kitahara, 2009). Em adição, somam-se as rápidas mudanças climáticas contemporâneas, as quais são os principais desafios à conservação dos ecossistemas recifais (Smith & Buddemeier, 1992; Maier *et al.*, 2009; Veron *et al.*, 2009; Leão *et al.*, 2010). De acordo com Bijlsma & Loeschcke (2005) o estresse ambiental causado por estas mudanças pode ser considerado como uma força modeladora na adaptação e evolução. Ao nível específico, acredita-se que o “efeito modelador” depende do período de tempo em que as mudanças climáticas ocorrem,

ou seja, se elas são demasiadamente rápidas ou abruptas é provável que a maioria das espécies não se adaptem às novas condições (Veron, 2008). Apesar do aspecto negativo, em alguns casos, mudanças ambientais agindo ao longo de milhares de anos podem também gerar processos adaptativos/evolutivos, como por exemplo, as alterações climáticas que causaram os cinco maiores eventos de extinção em massa conhecidos, os quais são marcados pelo desaparecimento de vários grupos taxonômicos do registro fóssil, seguido de processos evolutivos, onde novas espécies foram originadas (Veron, 2008). Embora ameaçados, adaptações e a utilização de refúgios em águas profundas provavelmente já auxiliaram na sobrevivência da linhagem da ordem Scleractinia (Kitahara, 2011) muito antes da origem da família Dendrophylliidae. No entanto, apesar da resistência a perturbações climáticas globais pretéritas, o futuro do grupo como um todo é incerto frente às rápidas mudanças com magnitudes sem precedentes nos últimos 300 M.a. (KieSSLing & Simpson, 2011), o que pode diminuir a oportunidade para processos adaptativos (Veron *et al.*, 2009).

As variações na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e, conseqüentemente, da química da água do mar são considerados os principais responsáveis pelas extinções em massa no ambiente marinho (Hautmann, 2004; Zachos *et al.*, 2005; Veron, 2008). Em consonância, são notórias as “crises” recifais que se sucederam após cada um destes eventos, sendo as mesmas caracterizadas pela ausência de recifes no registro fóssil por milhões de anos (Veron, 2008). Esses períodos em que os corais escleractíneos estiveram ausentes foram tão longos que são referidos como “reef-gaps” (intervalos geológicos onde não há vestígios do que poderia ter sido um recife) e, durante esses momentos os ecossistemas recifais antes dominados por organismos que secretavam carbonato de cálcio, passaram a ser dominado por espécies não calcificantes, e os restos geológicos destes ambientes foram erodidos (Veron, 2008).

O impacto oriundo da alteração do ciclo do carbono nos ecossistemas recifais é causado, principalmente, pelo aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico que é amplamente absorvido pelos oceanos, reduzindo assim, a profundidade de saturação da aragonita e o *pH* da água do mar, que por sua vez diminui a disponibilidade de íons de carbonato/bicarbonato, dificultando severamente a calcificação e crescimento dos corais, e, eventualmente, provocando erosão e dissolução dos recifes (Guinotte *et al.*, 2006; Schneider & Erez, 2006; Hoegh-

Guldborg *et al.*, 2007; Veron, 2008; Maier *et al.*, 2009; Gattuso *et al.*, 2010; Kiessling & Simpson, 2011). Além disso, dentre as principais estruturas de carbonato de cálcio (aragonita e a calcita) formadas por organismos marinhos calcificadores, as compostas por aragonita, secretadas pelos corais escleractíneos, são mais solúveis do que as de calcita, tornando-os mais vulneráveis ao baixo estado de saturação de carbonato da água do mar. Estudos a partir de experimentos *in vitro* estimam uma diminuição de ~ 10-55% na calcificação de inúmeras espécies de corais quando as concentrações de CO<sub>2</sub> dobrarem (pCO<sub>2</sub> ~ 560 ppm) (Leclercq *et al.*, 2000, 2002; Langdon *et al.*, 2003; Marubini *et al.*, 2003; Schneider & Erez, 2006), o qual está previsto para acontecer os próximos 50-100 anos (Houghton *et al.*, 1995).

Adicionalmente, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico também é responsável pelo aumento da temperatura nos oceanos, o qual é responsável pelo impacto nos recifes de corais gerado pela quebra da relação simbiótica entre coral-zooxantela, fenômeno conhecido como branqueamento (Veron, 2008; Leão *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2012), além de causar mudanças significativas na comunidade recifal. Devido a grande variedade morfológica e ecológica encontrada da família Dendrophylliidae, aliada aos registros fósseis de sua sobrevivência em ao menos um dos eventos de extinção em massa (Final do Cretáceo), este trabalho tem como objetivo realizar uma reconstrução da história evolutiva da família utilizando marcadores moleculares (mitocondriais – CO1 e 16S rDNA, e nuclear – 28S rDNA), fornecendo assim informações potencialmente relacionadas não apenas ao desenvolvimento/perda do crescimento colonial em metazoários inferiores, mas também a questões acerca de adaptações ambientais, como eventos de migração entre ambientes rasos e profundos, e ao estado simbiótico de seus representantes ao longo de suas respectivas histórias evolutivas. Adicionalmente, formam propostas hipóteses relacionadas aos caracteres ancestrais deste grupo, e, através do correlacionamento com aspectos paleoambientais, foram identificadas algumas das principais mudanças ambientais globais possivelmente responsáveis pelos eventos de divergência entre os clados recuperados. Em conjunto, estes resultados são o cerne para o desenvolvimento da hipótese que mudanças climáticas globais atuaram diretamente em processos adaptativos/evolutivos nos corais dendrofilídeos, havendo correlação direta entre os tempos de divergências dos clados que possuem características morfológicas (i.e.: solitário/colonial), de habitat (i.e.: raso/profundo) ou

de simbiose (i.e.: presença/ausência/facultatividade) com mudanças climáticas globais ocorridas nos últimos 150 M.a.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 MATERIAL: LOCALIZAÇÃO E PRESERVAÇÃO

Para a reconstrução filogenética de Dendrophylliidae foram utilizadas sequências moleculares de fragmentos de genes mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e nuclear (28S rDNA) obtidas no presente estudo em combinação com todos os dados destes marcadores disponíveis no GenBank. Desta forma, 15 dos 20 gêneros recentes da família, totalizando 96 espécies para CO1, 54 espécies para 16S rDNA, e 74 espécies para 28S rDNA estão representadas nas reconstruções filogenéticas. Quando estes marcadores moleculares foram utilizados em conjunto em apenas uma reconstrução (i.e.: concatenados) totalizou-se 40 espécies (Tabela 5). Amostras dos gêneros *Dichopsammia*, *Endopsammia*, *Notophyllia*, *Pourtalopsammia* e *Trochopsammia* não foram adicionados ao presente trabalho devido ao reduzido número de espécimes coletados e/ou preservação inadequada para análises moleculares. Apesar de amostras de espécies destes gêneros estarem depositadas em coleções ao redor do mundo, elas são raras e normalmente apenas seus esqueletos foram preservados. Sequências nucleotídicas de três representantes da família Poritidae (*Porites lobata*, *P. rus* e *P. cylindrica*) foram utilizadas nas análises como grupo externo.

Os espécimes de Dendrophylliidae utilizados neste trabalho se encontram depositados no *National Museum of Natural History* (NMNH – Estados Unidos da América), *Muséum national d'Histoire naturelle* (MNHN – França), Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP – Brasil), no *The National Institute of Water and Atmospheric Research* (NIWA – Nova Zelândia) e na *Università degli Studi di Milano-Bicocca* (UNIMIB – Itália). A vasta maioria dos espécimes de oceano profundo utilizados no presente trabalho foram coletados através de esforços do MNHN e do *Institut de recherche pour le développement* (IRD – Nouméa) ao largo da Zona Econômica Exclusiva da Nova Caledônia. Espécimes adicionais foram coletados em expedições australianas, americanas, neozelandesas e italianas, nos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico, entre profundidades de 93 a 534 m (Tabela 4 ) durante 2000 e 2011, sendo posteriormente preservados em etanol.

## 2.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA, REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA E SEQUENCIAMENTO

Para a extração de DNA genômico total, amostras de tecido foram retiradas do mesentério de cada espécime com auxílio de pinça ou, se o indivíduo era pequeno, o mesmo (incluindo esqueleto) foi submerso na solução tampão de extração de DNA. A extração de DNA foi realizada utilizando o *DNA Blood and Tissue kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante, e a concentração final de cada extração foi mensurada através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Quando necessário, alíquotas de DNA foram diluídas para uma concentração final de aproximadamente 40 ng/μl. A qualidade do DNA genômico extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1%). Posteriormente, porções do genoma mitocondrial (genes 16S rDNA e CO1) e nuclear (28S rDNA) foram amplificados pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando o *Kit TopTaq DNA Polymerase* (Qiagen), o *Kit Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies), ou ainda o *Kit Advantage 2 Polymerase Mix* (Clontech), seguindo as instruções dos fabricantes e os marcadores moleculares e condições descritas abaixo:

Gene mitocondrial ribossomal 16S (16S rDNA) – Os *primers* CS-R19 (5'-ACAGTCTGTTCTACTACCAAGC) e CS-F19 (5'-GTGAGTCATCGGGCTCATG) (Lin *et al.*, 2011) foram utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 1.065 pb, sob as condições: 3 min à 95°C seguido de 30 ciclos de 30 s à 94°C, 45 s à 50°C, e 90 s à 72°C, sendo finalizado aos 72°C por 10 min.

Gene Citocromo Oxidase subunidade 1 (CO1) – Os *primers* “universais” ZCO1 (5'-TCAACTAATCATAAAGATATTGGTACG) e ZCO1R (5'-TAAACCTCTGGATGCCAAA) (Forsman *et al.*, 2009) foram utilizados para amplificar um segmento de aproximadamente 760 pb, sob as seguintes condições: 2 min à 96°C seguido de 30 ciclos de 10 s à 96°C, 20 s à 50°C, e 90 s à 72°C, sendo finalizado aos 72°C por 7 min.

Gene nuclear ribossomal 28S (28S rDNA) – Os *primers* F63sq (5'-AATAAGCGGAGGAAAAGAAAC) e R2077sq (5'-GAGCCAATCCTTWTCCC GARGTT), desenvolvidos por Medina *et al.* (2001) foram utilizados sob as



condições: 3 min à 95°C seguido de 30 ciclos de 30 s à 45°C, 60 s à 45°C, e 120 s à 65°C, sendo finalizado aos 72°C por 10 min. Como a região do gene entre os *primers* F63sq e R2077sq é muito extensa para sequenciamento direto (cerca de 2.000 pb), para algumas espécies esta região foi dividida em duas reações de PCR com a utilização dos *primers* F63sq/R1411 e F635sq/R2077sq, ambos também desenvolvidos por Medina *et al.* (2001).

Todos os ciclos de PCR foram realizados com a utilização do termociclador *Mastercycler gradiente* ou *Mastercycler Nexus Gradiente* (ambos da Eppendorf), e os produtos das amplificações do DNA validados por eletroforese em gel de agarose (1%). Todos os *amplicons* resultantes foram enviados para sequenciamento direto na MacroGen (Coreia). As sequências obtidas foram verificadas e manipuladas no *software* Sequencher v. 5.1 (Gene Codes) e, posteriormente, cada sequência foi comparada no programa *Blast search* do GenBank e aquelas que corresponderam à homólogos de Dendrophylliidae foram utilizadas para o alinhamento.

### 2.2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências obtidas pela técnica de PCR em conjunto com as recuperadas do GenBank foram alinhadas com a utilização do *software* ClustalX 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). O alinhamento resultante foi verificado e editado no *software* GeneDoc 2.7 (Nicholas *et al.*, 1997). Para o marcador molecular 28S rDNA foi utilizado o programa Aliscore v.2.0 (Misof & Patrick, 2009) para a remoção de regiões ambíguas no alinhamento.

As reconstruções filogenéticas foram realizadas através de Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana. Cada *loci* foi analisado separadamente e depois foram concatenados em uma única matriz. O modelo evolutivo ou de substituição de nucleotídeos para cada marcador foi estimado utilizando-se o *Software* MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) e confirmados no JModelTest 2.1.3 (Darriba *et al.*, 2012). Para todos os marcadores, o modelo evolutivo GTR+G+I (Tavaré, 1986) foi recuperado como o que melhor descreve a substituição de nucleotídeos. As análises de Máxima Verossimilhança foram realizadas usando o programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010; <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>), sendo os

valores de suporte estatístico calculados com base em 100 réplicas de bootstrap e também com sh-like. Para as inferências bayesianas (realizadas no *software* Mr. Bayes [Ronquist & Huelsenbeck, 2003]), duas análises em paralelo, cada com 10.000.000 de gerações foram realizadas para cada reconstrução evolutiva (i.e. 16S rDNA, CO1, 28S rDNA e genes concatenados), utilizando o mesmo modelo evolutivo supracitado. Ao final de cada inferência foi constatada a convergência entre corridas, com frequências entre as mesmas igual ou inferior a 0.01. De forma geral, a cada 1.000 gerações, uma foi salva, totalizando 10.000 topologias, das quais o primeiro quarto (i.e.: 2.500 topologias) foi descartado, e as demais utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores.

Por fim, utilizando os registros fósseis de representantes da família que podem ser inequivocamente agrupados com gêneros utilizados no presente estudo, foi calculada a divergência dos principais clados recuperados a partir de relógio molecular relaxado implementado no *software* BEAST (Drummond & Rambaut, 2007). A calibração desta análise foi realizada com as datações do início do período geológico em que os fósseis de representantes dos gêneros *Palaeopsammia*, *Enallopsammia*, *Turbinaria*, *Rhizopsammia* e *Tubastraea* foram registrados (ver Cairns, 2001), uma vez que *Palaeopsammia* é o gênero mais antigo da família, e os demais gêneros foram recuperados como monofiléticos na análise de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Os períodos de ocorrência (fósseis) e de origem (gêneros existentes) são mostrados na figura 6.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Sequências nucleotídicas parciais dos marcadores moleculares mitocondriais CO1 (40 espécies) e 16S rDNA (34 espécies), e do marcador nuclear 28S rDNA (32 espécies) totalizando 84 espécimes e representando 44 espécies de corais escleractíneos pertencentes a família Dendrophylliidae (e Poritidae como grupo externo) foram obtidas pelo método de PCR e sequenciamento por capilar. Adicionalmente, a busca por sequências homólogas no GenBank resultou em 43 sequências de dendrofilídeos adicionais, dos quais 21 são do marcador molecular mitocondrial CO1 e 22 são do marcador nuclear 28S rDNA. Para o marcador molecular mitocondrial 16S rDNA não foi recuperada nenhuma sequência neste banco de dados. Assim, as 34 sequências da região do 16S amplificadas (subunidade grande do gene ribossomal - *rnl* -, compreendendo 934 pb) neste trabalho são as primeiras para a família. O alinhamento concatenado dos três marcadores moleculares (CO1, 16S rDNA e 28S rDNA) compreendeu 40 sequências comuns entre eles, representando 32 espécies de Dendrophylliidae (Tabela 5) e seu comprimento após editado (i. e. retirada dos gaps referentes aos nucleotídeos das espécies não inclusas neste alinhamento) totalizou 3.452 pb, dos quais aproximadamente 575 pb pertencem ao CO1, 934 pb ao 16S rDNA e 1.976 pb ao 28S rDNA. De forma geral, o marcador nuclear (28S rDNA) foi o *locus* mais variável, com um total de 336 pb dos quais 241 são filogeneticamente informativos. Em contrapartida, os marcadores mitocondriais variaram 92 e 101 pb para o 16S rDNA e CO1, totalizando 68 e 78 *loci* filogeneticamente informativos, respectivamente. Já o concatenado totalizou 448 pb que variaram, dos quais 318 são filogeneticamente informativos.

As topologias recuperadas por Máxima Verossimilhança foram consistentes com as baseadas em inferências Bayesianas em todas as reconstruções que utilizaram os marcadores moleculares individuais (16S rDNA, CO1 e 28S rDNA – Figura 9, 10, e 11, respectivamente). Entretanto as topologias geradas por estas análises e pelo relógio molecular relaxado diferem quando estes marcadores

moleculares foram analisados em conjunto (i.e. concatenados) em uma mesma matriz. As árvores filogenéticas resultantes do relógio molecular relaxado e da inferência Bayesiana, para os marcadores concatenados (Figura 8 e 12, respectivamente), não recuperaram o clado basal composto pelos táxons azooxantelados *Eguchipsammia serpentina*, *Cladopsammia eguchii* e *Balanophyllia* sp. (K294 e 92), e *Heteropsammia cochlea* (simbiose facultativa), o qual foi recuperado por Máxima Verossimilhança (Figura 13). Representantes de *Dendrophyllia*, *Balanophyllia*, *Heteropsammia*, *Eguchipsammia*, *Cladopsammia*, *Enallopsammia* e *Turbinaria* foram recuperados em clados monofiléticos na topologia do relógio molecular relaxado e na análise de Máxima Verossimilhança, mas formaram uma politomia na inferência Bayesiana. Na ML, o clado basal recuperado não compreendeu os mesmos táxons recuperados nos ramos mais profundos das análises dos marcadores individuais. Desta forma, dentre as reconstruções filogenéticas com base nos marcadores moleculares concatenados, a obtida através do relógio molecular foi considerada a mais consistente e, consequentemente, descrita e discutida neste trabalho. Apesar disso, a monofilia da família Dendrophylliidae foi recuperada com bom suporte de ramo em todas as análises filogenéticas, corroborando, desta forma, com as propostas de Romano & Cairns (2000), Le Goff-vitry *et al.* (2004), Kerr (2005), Fukami *et al.* (2008), Kitahara *et al.* (2010) e Arrigoni *et al.* (2014). No nível de gênero, entretanto, muitos grupos foram recuperados como para-polifiléticos.

Dois clados principais foram recuperados na topologia da família Dendrophylliidae na topologia gerada por relógio molecular relaxado (Figura 8). Destes, o primeiro a divergir possui baixo valor de suporte e compreende dois grupos, um formado pelos táxons de oceano profundo *Dendrophyllia alcocki* e *Cladopsammia echinata* que são coloniais, junto com a solitária *Balanophyllia* sp. (K291B), e o outro que compreende os sub-clados: i) *Balanophyllia* sp. (K294, 92) (solitárias), *Heteropsammia cochlea* (solitária e colonial), *Cladopsammia eguchii* (colonial) e *Eguchipsammia serpentina* (quasicolonial), que com exceção da *H. cochlea* que ocorre em água rasa e apresenta simbiose facultativa, são de oceano profundo e azooxanteladas; ii) as *turbinárias* que, com exceção de *T. peltata* que está mais próxima de *Duncanopsammia axifuga* do que de suas congêneres, foram recuperadas como monofiléticas; e iii) as *Enallopsammia* (coloniais) e *Eguchipsammia* sp. (90) (quasicolonial) que ocorrem em oceano profundo. O baixo

valor de suporte deste clado reflete as diferenças entre a topologia recuperada por relógio molecular relaxado e as obtidas pelas análises de Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana, uma vez que estas análises não o recuperaram. O segundo agrupamento da família, por sua vez, compreende as demais espécies analisadas e apresenta bom valor de suporte em todas as análises filogenéticas realizadas para os marcadores moleculares concatenados.

Do mesmo modo como foi recuperada nas análises filogenéticas que utilizaram genes individuais, a vasta maioria dos gêneros de Dendrophylliidae foram recuperados como polifiléticos, sendo apenas *Rhizopsammia* (azooxantelada de água rasa e profunda), *Enallopsammia* (oceano profundo) e *Tubastraea* (azooxantelada de águas rasas) recuperados como possíveis clados monofiléticos com alto valor de suporte dos ramos. Entretanto, ainda é necessária a identificação do espécime *Tubastraea* sp. (MY105) que não se agrupou com suas congêneres, e sua identificação ao nível de gênero pode estar equivocada. Dentre as espécies morfológicamente identificadas como *Balanophyllia*, *B. europaea* e *B. regia* formaram um clado com bom suporte estatístico e estão mais relacionadas com *Astroides calycularis*, *Dendrophyllia cornigera* e *Leptopsammia pruvoti* do que com suas congêneres *B. imperialis*, *B. gigas* e *Balanophyllia* sp. (K295A), as quais foram recuperadas como um clado.

### 2.3.2 CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS

As características ecológicas dos 38 representantes da família Dendrophylliidae que compõem a reconstrução filogenética baseada nos marcadores concatenados são mostradas na figura 8. Destes, 22 ocorrem exclusivamente em ambientes de águas rasas e são na maioria azooxantelados (apenas sete zooxantelados e um com simbiose facultativa); 14 são de águas profundas e consequentemente azooxantelados; e apenas dois são azooxantelados e ocorrem tanto em águas rasas como em profundas. Assim, este é o primeiro estudo que consegue abarcar um número representativo das espécies de Dendrophylliidae ocorrentes em águas profundas.

Dos clados recuperados na reconstrução filogenética da família, os formados pelos táxons: i) *Turbinaria* (com exceção de *T. peltata*); e ii) *Duncanopsammia*

*axifuga* e *T. peltata* diferenciam-se dos demais por serem exclusivamente de águas rasas e pela presença da simbiose com as microalgas. Enquanto que o clado composto por *Tubastraea* spp. representa espécies azooxanteladas de águas rasas, e os compostos pelos táxos i) *Enallopsammia* e *Eguchipsammia* sp. (90), ii) *Dendrophyllia alcocki*, *Balanophyllia* sp. (K291B) e *Cladopsammia echinata*, e iii) *Balanophyllia gigas*, *B. imperialis* e *Balanophyllia* sp. (K295A) são exclusivamente de oceano profundo e por isso, não realizam simbiose com microalgas. Os demais clados recuperados são formados por espécies com diferentes características ecológicas, como: i) a zooxantelada *Balanophyllia europaea* que se agrupou com as azooxanteladas *Balanophyllia regia*, *Astroides calycularis*, *Dendrophyllia cornigera* e *Leptopsammia pruvoti* que, com exceção de *D. cornigera* são de águas rasas; e ii) *Eguchipsammia japonica*, *Dendrophyllia arbuscula*, *Rhizopsammia verrilli*, *R. wettsteini*, *R.* sp. (V291) e uma espécie de *Tubastraea* (de provável identificação incorreta - MY105) que possivelmente perderam a simbiose, sendo que *D. arbuscula* e *R. verrill* ocorrem tanto em águas rasas como em profundas, enquanto *R. wettsteini* e *E. japonica* são, exclusivamente de águas rasas e profundas respectivamente. Entretanto, os clados contidos no segundo agrupamento recuperado na reconstrução filogenética da família, o qual obteve elevado suporte estatístico, são compostos principalmente por espécies azooxanteladas (exceto *D. axifuga*, *T. peltata* e *B. europaea*).

### 2.3.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Dentre as 24 famílias recentes de Scleractinia, Dendrophylliidae se destaca por apresentar alta variedade morfológica e ecológica. Na reconstrução filogenética deste trabalho, entre os 38 representantes utilizados, nove são solitários (*Balanophyllia* e *Leptopsammia*), *Heteropsammia cochlea* pode ser solitário ou formar pequenas colônias (Veron, 1986), três representantes do gênero *Eguchipsammia* são quasicoloniais e as demais espécies são coloniais (Figura 8). Os quasicoloniais *Eguchipsammia* e os solitários pertencentes ao gênero *Balanophyllia* foram recuperados como altamente polifiléticos, o que sugere que ainda não existe consenso com relação à utilidade deste caractere morfológico com relação à delimitação de gêneros de corais dendrofilídeos. Já os táxons coloniais

foram mais bem resolvidos, com a recuperação de clados monofiléticos que condizem com as propostas morfológicas para os gêneros *Tubastraea*, *Rhizopsammia*, *Enallopsammia* e *Turbinaria* (com exceção de *T. peltata*).

#### 2.3.4 TEMPOS DE DIVERGÊNCIAS E A CORRELAÇÃO COM MUDANÇAS CLIMÁTICAS

A estimação do tempo de divergência dos Dendrophylliidae foi realizada pela análise de relógio molecular relaxado calibrado com registros fósseis de *Palaeopsammia*, *Enallopsammia*, *Rhizopsammia* e *Tubastraea* (ver Cairns, 2001). As análises moleculares combinadas com registros fósseis sugerem que os dendrofilídeos, logo no início de sua história evolutiva, divergiram em duas linhagens (Figura 8), sendo uma datada para o início do Cretáceo (ca. de 10 M.a. após a origem da família) e a outra para o final do Cretáceo (ca. 97.9 M.a.). Apesar do clado basal não ter sido recuperado na análise filogenética, representantes azooxantelados (oceano profundo) – *Enallopsammia* e *Eguchipsammia* – tiveram a divergência mais profunda da primeira linhagem da família.

No final do Cretáceo e durante o Paleoceno diversos eventos de divergência foram recuperados, sendo que um marca a formação do clado com alto valor de suporte composto quase que exclusivamente por táxons azooxantelados (com exceção de *Balanophyllia europaea*) e coloniais (com exceção de *Eguchipsammia japônica*, *Leptopsammia pruvoti* e das balanofílias): *Turbinaria*, *Rhizopsammia*, *Leptopsammia*, *Astroides*, *Balanophyllia europaea*, *B. regia*, *Dendrophyllia cornigera*, *D. arbuscula* e *E. japonica*. No limite entre o Paleoceno e Eoceno ocorreu a especiação das *Tubastraea*. No Oligoceno além das *Turbinaria* formarem uma linhagem, com exceção de *T. peltata* que precisa ser revista morfológicamente, houve a divergência de dois clados compostos por balanofílias de oceano profundo, e no Mioceno também ocorreram várias divergências, sendo destacada a formação da linhagem de *Rhizopsammia*. Posteriormente, no final do Neogeno e durante o Quaternário foram recuperados vários eventos de especiação.

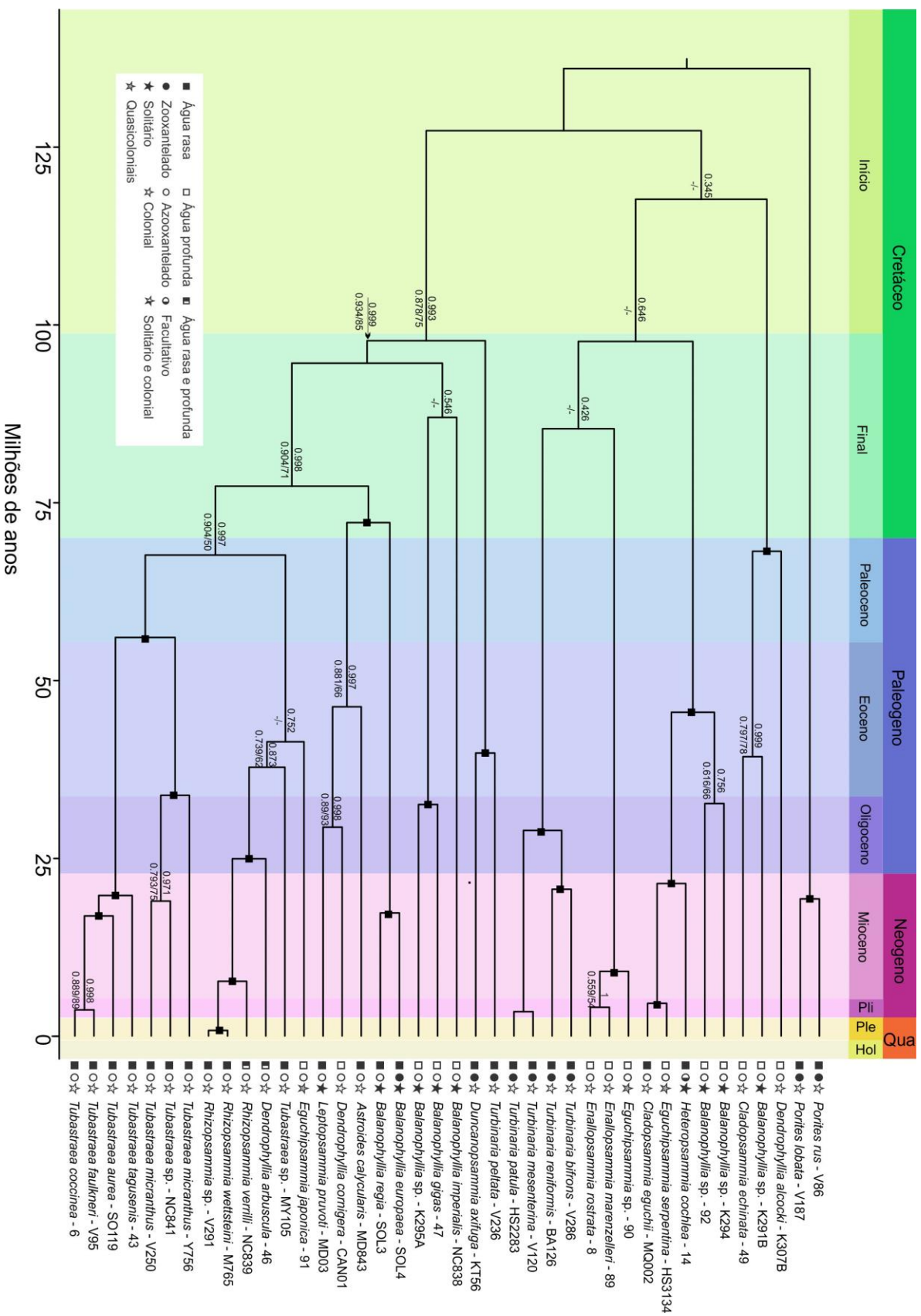




Figura 8: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada na análise de relógio molecular relaxado dos marcadores mitocondriais CO1 e 16S rDNA, e nuclear 28S rDNA. Os números nos ramos indicam a probabilidade posterior (acima) e o suporte sh-like e valor de bootstrap (abaixo) calculados usando os programas Beast e PhyML, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente). As características ecológicas (i.e.: habitat em que ocorrem e estado simbiótico) e morfológicas (i.e.: solitário ou colonial) são representadas pelas diferentes formas e cores relacionadas a cada espécie como: água rasa (<50 m) (quadrado preto); oceano profundo (>100 m) (quadrado branco); águas rasas e profundas (preto e branco); zooxantelado (circulo preto); azooxantelado (circulo branco); simbiose facultativa (circulo preto e branco); solitário (estrela preta); colonial (estrela branca); solitário e colonial (preto e branco); e quasicolonial (cinza).

## 2.4 DISCUSSÃO

### 2.4.1 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

A utilização de ferramentas moleculares para inferências filogenéticas tem dado suporte ao desenvolvimento de sistemas de classificação satisfatórias dos corais escleractíneos (Romano & Cairns, 2000; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Fukami *et al.*, 2008; Kitahara *et al.*, 2010). Entretanto, há uma discrepância entre as famílias compostas predominantemente de espécies de águas rasas e de oceano profundo, pois essas são monofiléticas enquanto que a maioria das famílias formadas principalmente por espécies zooxanteladas são polifiléticas (Fukami *et al.*, 2008; Kitahara *et al.*, 2010). Somado a isso, a falta de robustez dos caracteres morfológicos atualmente utilizados para a identificação de espécies é responsável por alguns representantes de Scleractinia possuírem altas distâncias genéticas entre seus espécimes, sendo em alguns casos comparadas às distâncias entre corais de gêneros diferentes (Vollmer & Palumbi, 2002; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004), resultando muitas vezes na existência de espécies crípticas (Le Goff-Vitry *et al.*, 2004). A família Dendrophylliidae, no entanto, é a única com representantes de águas rasas e profundas, bem como, com espécies zooxanteladas, azooxanteladas ou ainda com simbiose facultativa que é considerada monofilética (Cairns, 2001; Fukami *et al.*, 2008; Kitahara *et al.*, 2010; Arrigoni *et al.*, 2014; cap. 1).

Neste trabalho, baseado em marcadores moleculares mitocondriais (16S rDNA e CO1) e nuclear (28S rDNA) para 15 dos 20 gêneros recentes, abarcando

representantes de águas rasas e profundas, a monofilia dos dendrofilídeos é corroborada. Contudo, os tradicionais gêneros da família foram recuperados como polifiléticos, assim como encontrado por Arrigoni *et al.* (2014), e algumas espécies não foram recuperadas em um mesmo clado, podendo assim, serem prováveis espécies crípticas. De modo geral, dos gêneros com pelo menos duas espécies analisadas (i.e.: *Balanophyllia*, *Dendrophyllia*, *Cladopsammia*, *Eguchipsammia*, *Enallopsammia*, *Rhizopsammia*, *Tubastraea* e *Turbinaria*), apenas *Tubastraea*, *Enallopsammia* e *Rhizopsammia* foram recuperados como monofiléticos, corroborando assim com a taxonomia clássica.

Os gêneros *Balanophyllia*, *Eguchipsammia* e *Dendrophyllia* foram polifiléticos, tendo representantes agrupados em diversos clados recuperados. Atualmente, o gênero *Balanophyllia* compreende dois subgêneros: *Balanophyllia* e *Eupsammia* (Cairns, 2001), que morfologicamente se diferenciam pelo primeiro compreender espécies solitárias fixas a um substrato por uma base policíclica, enquanto *Eupsammia* compreende espécies de vida livre com base monocíclica. Estudos moleculares sugerem a polifilia de *Balanophyllia* e mostram que a distância genética entre os representantes dos subgêneros *Balanophyllia* e *Eupsammia* é maior do que o esperado para espécies congêneres (Kitahara *et al.*, 2010; Arrigoni *et al.*, 2014). Entretanto, no presente estudo, com um maior número de espécies pertencentes ao gênero *Balanophyllia* analisados (um representando o subgênero *Eupsammia* - *B. imperialis*; e oito do subgênero *Balanophyllia* - *B. dentata*, *B. cornu*, *B. desmphyloides*, *B. elegans*, *B. europaea*, *B. gigas*, *B. regia* e *B. laysanensis*; além das espécies não identificadas à nível específico), o representante do subgênero *B. Eupsammia imperialis* foi recuperado formando um clado com as balanofílias de oceano profundo *B. gigas* e *B. sp.* (K295A), o qual não se agrupou com o clado formado pelos representantes do gênero de água rasa (*B. regia* e *B. europaea*). Desta forma, existe a possibilidade da polifilia de *Balanophyllia* estar relacionada, entre outros fatores, a inúmeros eventos de migração entre ambiente de águas rasas e profundas, assim como a eventos de perda e ganho de colonialidade ao longo da história evolutiva do grupo.

Os representantes do gênero *Eguchipsammia*, embora sejam todos quasicoloniais e azooxantelados (oceano profundo), apresentam distância genética significativa. Entretanto, foram recuperados próximos a espécies azooxanteladas e coloniais, dos quais alguns ocorrem em águas rasas: *Eguchipsammia serpentina*

está mais relacionada com *Cladopsammia eguchii* (águas rasas); *Eguchipsammia* sp. foi recuperada com as representantes do gênero *Enallopsammia* (águas profundas); e *Eguchipsammia japonica* se agrupou com *Rhizopsammia* (águas rasas e profundas), *Dendrophyllia arbuscula* (água profunda) e *Tubastraea* sp. (água rasa). Desta forma, sua polifilia pode estar refletindo eventos de aquisição de colonialidade, além de potencialmente também estar relacionada com eventos de migração entre os ambientes de águas rasas e profundas.

Espécies pertencentes ao gênero *Dendrophyllia* são coloniais, possuem parede porosa e granulada, septos arranjados em plano de Pourtalès, columela bem desenvolvida podendo ser esponjosa ou trabecular (Pillai, 1967). Os representantes do gênero apresentam alta variabilidade morfológica dos coralitos e do corallum (Filkorn & Alor, 2004), e possuem três tipos de crescimento por brotamento extratentacular: i) colônias arborescentes com grandes coralitos axiais; ii) colônias espessas, com pequenos coralitos e poucas ramificações no caule principal; e iii) colônias com ramificação dendroide simpodial, sem coralitos axiais (Cairns, 1994, 2001), no entanto, as colônias mantêm uma regularidade no padrão de brotamento dos coralitos (Sentoku & Ezaki, 2012, 2013). Contudo, segundo Cairns (2001) as dendrofílias não apresentam caracteres específicos que as distinguem dos demais gêneros e sim uma combinação de caracteres morfológicos. Na reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae, embora todas as dendrofílias sejam semelhantes em relação à forma de crescimento arborescente e a presença de um plano de Pourtalès bem desenvolvido, o gênero foi recuperado como polifilético, além disso, seus representantes se agruparam com espécies de diferentes características ecológicas e morfológicas. *Dendrophyllia alcoki* foi recuperada com a solitária *Balanophyllia* sp. (K291B) e com a colonial *Cladopsammia echinata*, todas de águas profundas. *Dendrophyllia cornigera* que ocorre principalmente em mar profundo (200 a 500 m), embora seja registrada a 30 m de profundidade no Atlântico (Castric-Fey, 1996) se agrupou com as de águas rasas *Astroides calucularis* (colonial) e *Leptopsammia pruvoti* (solitária); já sua congênere *D. arbuscula* que ocorre em águas rasas e profundas foi mais relacionada com *Rhizopsammia verrilli* (água rasa e profunda), *R. wettsteini* (água rasa), *Rhizopsammia* sp. (V291), *Eguchipsammia japonica* (água rasa) e uma espécie de *Tubastraea* (possivelmente identificada de forma incorreta - MY105). Entretanto, *D. cornigera* apresenta coralitos grandes (cerca de 20 mm de diâmetro) suportados por uma base robusta (Castric-

Fey, 1996), além de possuir um número maior de septos e uma columela mais desenvolvida do que *D. arbuscula*, que por sua vez, é mais semelhante às espécies de *Rhizopsammia* analisadas neste trabalho por ter um menor número de septos, os quais são organizados em quatro ciclos, sendo os dois primeiros projetados acima da margem calicular (Sentoku & Ezaki, 2012; Arrigoni *et al.*, 2014). Desta forma, a polifila de *Dendrophyllia* e o agrupamento destas com espécies de diferentes características ecológicas e de integração dos pólipos (i.e. colonial ou solitário) são provavelmente, devido à homoplasia dos seus representantes, sendo necessária uma revisão do gênero.

O gênero *Cladopsammia* apresenta características morfológicas intermediárias entre as coloniais *Dendrophyllia* e *Rhizopsammia* (e.g.: integração entre os coralitos) (Cairns, 2001), sendo *Cladopsammia gracilis* considerado geneticamente indistinguível de *Rhizopsammia* (Arrigoni *et al.*, 2014). Entretanto, no presente estudo além do gênero *Cladopsammia* ser polifilético, seus representantes são mais relacionados com *Eguchipsammia*, *Heteropsammia*, *Balanophyllia* e *Tubastraea* do que com *Rhizopsammia*, além de que apenas *C. echinata* foi recuperada próximo do gênero *Dendrophyllia* (*D. alcocki*). Além disso, apesar de *C. gracilis* só ter sido incluída na reconstrução filogenética com base no marcador nuclear 28S rDNA, ela foi recuperada formando um clado com alto valor de suporte, junto com *Tubastraea coccinea*, *T. tagusenis*, *T. faulkneri* e *T. aurea* (ver material suplementar). Assim, as semelhanças morfológicas entre os gêneros *Dendrophyllia*, *Rhizopsammia* e *Cladopsammia* são provavelmente resultantes de convergência.

As espécies pertencentes ao gênero *Turbinaria* são zooxanteladas, coloniais e, além de apresentarem uma grande variedade de formas de crescimento, são construtoras de recifes de águas rasas (Cairns, 2001). Apesar da alta variabilidade morfológica, as turbinárias, com exceção de *T. peltata*, foram recuperadas formando um clado monofilético, enquanto *T. peltata* foi mais relacionada com *Duncanopsammia axifuga* do que com suas congêneres. Em análises morfológicas, *T. peltata* é facilmente distinta de suas congêneres devido aos coralitos serem maiores e a sua columella mais larga em relação ao tamanho do cálice. Adicionalmente, *T. peltata* não é considerada sinonímia da espécie tipo de *Turbinaria* (Arrigoni *et al.*, 2014). Desta forma, Arrigoni *et al.* (2014) sugerem a transferência de *T. peltata* para o gênero *Duncanopsammia*. Entretanto, na nossa reconstrução filogenética baseada no marcador nuclear 28S rDNA, *T. peltata* foi

recuperada em um clado junto com *Turbinaria irregularis*, a qual foi analisada apenas com este marcador (ver material suplementar). O gênero *Tubastraea* considerado grupo irmão de *Turbinaria*, de modo geral, diferencia-se deste por ser azooxantelado e possuir a costa granulada ao invés de cristas serrilhadas (Cairns, 2001). No presente trabalho, no entanto, os representantes destes gêneros ficaram bem distantes, sendo *Tubastraea* recuperado em um clado monofilético com alto valor de suporte, com exceção de um espécime (*Tubastraea* sp. MY105) que pode ter sido identificado erroneamente.

#### 2.4.2 HISTÓRIA EVOLUTIVA

Registros fósseis sugerem que os dendrofilídeos surgiram no início do Cretáceo (ca. 127 M.a.), período no qual as condições ambientais em águas rasas não eram favoráveis aos escleractíneos, sendo consideradas até mesmo limitantes para o desenvolvimento dos recifes de corais (Rosen, 2000), os quais ocorriam com baixa abundância e provavelmente diversidade (Veron, 1995). De maneira geral, o Cretáceo foi um período marcado pelo “efeito estufa” (Gale, 2000). Registros geológicos revelam que a temperatura global e os níveis de CO<sub>2</sub> estimados para o início deste período eram de pelo menos 6 a 14°C e 5 a 10 vezes, respectivamente, mais elevados do que no presente (Barron, 1983; Berner, 1994; Tajika, 1999; Raven *et al.*, 2005). Consequentemente, os oceanos eram calcícticos e os moluscos rudísticos eram os principais formadores de recifes (Scott, 1995; Stanley & Hardie, 1998). Além disso, as águas de oceano profundo eram quentes e salinas devido à alta evaporação das áreas de baixa latitude, o nível do mar era alto e o interior dos principais continentes estava coberto por mares rasos (Gale, 2000).

No Cretáceo Médio, grandes mudanças ambientais oriundas principalmente de processos tectônicos, alta atividade vulcânica e aumento da crosta oceânica associados principalmente com a “quebra” do continente Gondwana (Gale, 2000; Fluteau *et al.*, 2007); resultaram em eventos de anoxia oceânica, enriquecimento de nutrientes nos oceanos e avanço do mar em mais de 300 m, causando a inundação de cerca de 40% dos continentes e deixando apenas 18% da superfície terrestre emersa (Scott, 1995; Tajika, 1999; Keller, 2003, 2005; Erba, 2004; Veron, 2008). Esta transgressão marinha coincide com a formação da segunda linhagem da

família Dendrophylliidae, a qual foi recuperada compreendendo espécies quase que exclusivamente azooxanteladas que habitam águas rasas. Desta forma, o avanço do mar provavelmente promoveu a invasão de espécies de oceano profundo para o ambiente de águas rasas, assim como é proposto para outros táxons (Perfetta *et al.*, 1999; Cetean *et al.*, 2011). Posteriormente, com a regressão marinha, as espécies adaptadas às novas condições ambientais características de águas rasas, sobreviveram e passaram por processos evolutivos, os quais promoveram a diversificação e a formação desta nova linhagem da família.

As condições ambientais extremas verificadas no Cretáceo somadas aos meteoros que atingiram a Terra no final deste período, principalmente o Chicxulub que colidiu próximo à península de Yucatan, no Sudeste do México, provocando enormes tsunamis, atividades vulcânicas, liberação de gases ricos em carbonato e sulfato, além de causar longos períodos de escuridão e chuva ácida, são indicados como os principais fatores responsáveis pela extinção em massa no final do Cretáceo, marcando assim o fim da Era Mesozóica (Pope *et al.*, 1997; Pickering, 2000; Kiessling & Baron-Szabo, 2004; Keller, 2008; Veron, 2008; D'Hondt, 2015). Consequentemente, houve uma intensa redução na produção de carbonato de cálcio durante esse evento (Hallam & Cohen, 1989; Stanley, 2003), o qual provavelmente está diretamente relacionado à extensa diminuição da biodiversidade marinha das regiões tropicais, principalmente dos ecossistemas recifais, os quais foram extremamente comprometidos, com aproximadamente 33% das famílias e 70% de todos os gêneros de corais extintos (Veron, 1995, 2008). Adicionalmente, das 204 espécies conhecidas para esse momento, apenas 106 (52%) sobreviveram (Baron-Szabo, 2008).

Embora severamente comprometidos, os corais escleractíneos apresentaram um gradiente latitudinal na taxa de extinção no final do Cretáceo, sendo observada uma diminuição com o aumento da latitude (Kiessling & Baron-Szabo, 2004). Segundo Kiessling & Baron-Szabo (2004), este padrão está provavelmente relacionando à maior resistência das espécies azooxanteladas ocorrentes em altas latitudes somado a suas respectivas distribuições geográficas mais abrangentes e ao fato do risco de extinção ter sido maior para os corais coloniais, principalmente aqueles com alta integração coralínea, característicos de espécies zooxanteladas que habitam regiões tropicais (Kiessling & Baron-Szabo, 2004; Veron, 2008). Desta forma, uma das hipóteses para o colapso dos recifes de

corais após a extinção em massa do Cretáceo é a perda da simbiose dos corais com as zooxantelas, uma vez que os zooxantelados teriam sido mais afetados que os azooxantelados, assim como as formas coloniais em relação aos solitários (Rosen & Turnšek, 1989; Rosen, 2000; Kiessling & Baron-Szabo, 2004). Em contraste, Veron (2008) sugere que todos os corais, azooxantelados e zooxantelados, podem ter sido afetados com a mesma intensidade, uma vez que sobreviveram no máximo três gêneros em cada família de Scleractinia após a extinção do final do Cretáceo, com exceção da azooxantelada Caryophylliidae que perdeu metade dos 27 gêneros (Veron, 1995).

Embora não esteja claro as características dos corais mais afetados com a extinção em massa no final do Cretáceo, a família Dendrophylliidae, recém-originada e de modo geral, formada por poucas espécies provavelmente solitárias e azooxanteladas (Cairns, 2001), apresentou baixa taxa de extinção (Kiessling & Baron-Szabo, 2004) e os representantes do gênero *Dendrophyllia* são frequentes nas várias assembleias de corais do início do Paleoceno (Daniano) (e.g.: *D. candelabrum* – [Bernecker & Weidlich, 1990]). Em adição, a presente reconstrução filogenética recupera três divergências principais neste período, as quais posteriormente deram origem a linhagens que compreendem espécies com diferentes características morfológicas e ecológicas como, por exemplo, as solitárias *Balanophyllia regia* (azooxantelada de oceano profundo) e *B. europaea* (zooxantelada), e a colonial *Astroides calycularis* (azooxantelada de águas rasas). Entretanto, estas linhagens não compreendem nenhuma espécie que seja colonial e zooxantelada.

Apesar do colapso dos recifes de corais no final do Cretáceo, eventos de extinção em massa são seguidos por processos evolutivos, como a especiação (Budd, 2000). Assim, no Paleoceno são documentadas 55 novas espécies pertencentes a 19 gêneros de Scleractinia, dos quais dois são dendrofilídeos (Baron-Szabo, 2008). Entretanto, assim como o final do Cretáceo, o início do Cenozóico foi marcado por diversas perturbações climáticas associadas a processos tectônicos, às altas concentrações de gases estufa – concentração de CO<sub>2</sub> entre 300 - 420 ppmv (Kleypas *et al.*, 2006) -, e aos vários eventos de aquecimento global. Consequentemente, nesse período havia pouco ou nada de gelo nas regiões polares (Pickering, 2000; Zachos *et al.*, 2001, 2008; Royer, 2006). Desta forma, embora algumas espécies de corais tenham surgido no Paleoceno, os recifes tropicais

continuaram ausentes e as poucas formações existentes apresentavam baixa deposição de carbonato e diversidade.

De maneira geral, no Terciário houve uma tendência de esfriamento, com diminuição de cerca de 10°C da temperatura do oceano profundo, além de glaciações, ocorrência de processos tectônicos globais, flutuações do nível médio do mar e vulcanismos (Barron, 1985; Pickering, 2000; Veron, 2000; Zachos *et al.*, 2008). Apesar das temperaturas serem mais baixas do que as do Cretáceo, são verificados períodos pontuais extremamente quentes, como durante o Paleoceno que tem seu limite marcado pelo evento de Máximo Termal do Paleoceno e Eoceno (MTPE) (Zachos *et al.*, 2008; Zamagni *et al.*, 2012). Esse evento é relacionado com altas concentrações de CO<sub>2</sub> absorvidas pela atmosfera e oceanos, bem como pelo aumento superior a 5°C da temperatura global em menos de 10.000 anos e com a diminuição no gradiente de temperatura entre a termoclina e água de mar profundo. Em consequência houve diminuição do *pH* da água do mar (cerca de 0,6 unidades mais baixas que atualmente) e da profundidade de compensação da aragonita, além do acréscimo do fluxo de nutrientes nos oceanos devido ao aumento do intemperismo (Raven *et al.*, 2005; Zachos *et al.*, 2005, 2008; Kleypas *et al.*, 2006; Kiessling & Simpson, 2011; Zamagni *et al.*, 2012).

As alterações ambientais causadas pelo MTPE resultaram em mudanças nos ecossistemas recifais deste período, uma vez que houve uma redução na capacidade de construção de recifes, além de variações na composição da comunidade recifal devido a propagação dos organismos mais adaptados à tolerar a “deterioração” das condições da água do mar (notavelmente as algas calcárias), gerando assim, novas associações entre estes organismos e os corais escleractíneos (Stanley, 2003, Zamagni *et al.*, 2012). Somado a isso, uma vez que as altas temperaturas provavelmente agiram como “estressores limitantes” aos corais zooxantelados construtores de recifes (Zamagni *et al.*, 2012) e a grande quantidade de nutrientes ter aumentado a competição biológica ao disponibilizar espaço para as espécies azooxanteladas prosperarem (Ciarapíea & Passeri, 1993), temos os corais azooxantelados como os principais formadores de recifes neste período (Baron-Szabo, 2008), e a indicação molecular da divergência das *Tubastraea*.

De modo geral, o MTPE somado às altas temperaturas que se seguiram ao longo do Eoceno são responsáveis pela extinção de muitos organismos bentônicos



calcificantes de regiões tropicais, principalmente de águas rasas, bem como por uma crise recifal (Kiessling *et al.*, 2010), uma vez que além do desaparecimento gradual dos corais construtores de recifes nestes períodos (Scheibner & Speijer, 2008a), houve uma redução do volume total destes ecossistemas (Zamagni *et al.*, 2012). Entretanto, extensas áreas de mar profundo e regiões de altas latitudes foram colonizadas por corais neste intervalo geológico, sugerindo que estas regiões serviram de refúgios aos escleractíneos devido às altas temperaturas e irradiação de energia solar nas zonas tropicais (Zamagni *et al.*, 2012), assim como ocorreu em períodos anteriores da história evolutiva da ordem Scleractinia (ver Stolarski *et al.*, 2011).

Após o Eoceno, são registrados vários episódios de aquecimento e esfriamento global, bem como o derretimento e formação de calotas polares, os quais são relacionados com mudanças na circulação oceânica e atmosférica, perturbações tectônicas e variações no nível do mar (Zachos *et al.*, 2001). Estas mudanças globais são consideradas responsáveis por vários picos de extinção e recuperação dos recifes de corais (Budd, 2000; Stanley, 2003; Heydt & Dijkstra, 2006), e aqui recuperados como eventos de divergência da família Dendrophylliidae. No Oligoceno houve uma diminuição na concentração de CO<sub>2</sub> e da temperatura global, causando uma longa glaciação responsável pela rápida expansão das calotas polares na Antártica (50% maiores do que as atuais), as quais persistiram até o final deste período (26 a 27 M.a.) quando houve uma tendência de aquecimento global até metade do Mioceno (cerca de 15 M.a.) (Zachos *et al.*, 2001, 2008; Heydt & Dijkstra, 2006). O derretimento das camadas de gelo formadas no Oligoceno somado com mudanças na configuração continental ocorridas neste período (Heydt & Dijkstra, 2006) disponibilizaram novas áreas para colonização, evidenciado pela divergência de vários dendrofilídeos de águas rasas (e.g. *Heteropsammia cochlea* e *Tubastraea tagusensis*).

Embora o início do Cenozóico seja marcado por extremas mudanças climáticas globais, principalmente as relacionadas com variações na temperatura global, os corais escleractíneos resistiram a estas perturbações e, de forma geral, se recuperaram no Oligoceno (Zamagni *et al.*, 2012), quando houve glaciação e os oceanos tornaram-se aragoníticos novamente (Stanley & Hardie, 1998). A mudança na química do carbonato da água do mar, ou seja, a alternância do estado do “mar calcítico” (com baixo MgCO<sub>3</sub>), característico de intervalos de efeito estufa para “mar

aragonítico” (com alto  $MgCO_3$  e aragonita) durante o período glacial do Oligoceno (Veron, 2011) possibilitou a construção dos recifes de corais devido ao aumento da razão Mg/Ca, que favorece a calcificação dos organismos que secretam aragonita (Stanley & Hardie, 1998). Desta forma, além dos recifes coralíneos terem atingido um volume significativo no Oligoceno (Zamagni *et al.*, 2012), as regiões tropicais e subtropicais foram novamente colonizadas (Geel, 2000; Scheibner & Speijer, 2008b), tornando-se um centro de novidades evolutivas (Kiessling & Baron-Szabo, 2004), além de promover mudanças estruturais e ecológicas de tal forma que os recifes formados nesta época são considerados análogos aos modernos.

Entre as mudanças que ocorreram nos recifes de corais a partir do Oligoceno, se destacam a dominância de corais com formas ramificadas e com muitos coralitos por ramo, além da presença de corais zooxantelados com esqueleto poroso (Stanley, 2003) e o brotamento intratentacular nos dendrofilídeos (e.g.: *Lobopsammia*) (Cairns, 2001). Adicionalmente, a maioria das famílias de Scleractinia que atualmente são importantes construtoras de recifes, surgiram entre o Eoceno e o Oligoceno (Rosen, 2000; Kleypas *et al.*, 2006), assim como alguns dos principais representantes da família Dendrophylliidae considerados formadores de recifes (i.e. *Turbinaria*, *Astroides calycularis* e *Tubastraea micranthus*), as quais foram recuperadas divergindo neste período. A recuperação dos ecossistemas recifais neste período é marcada também nos registros fósseis, pois a partir do final do Eoceno, os corais escleractíneos, entre eles representantes da família Dendrophylliidae, passaram a ser importantes componentes da assembleia fóssil (Cairns, 2001; Stanley, 2003).

Durante o Plioceno médio ocorreram novamente temperaturas extremamente altas. Embora as causas dessa mudança climática ainda não sejam bem compreendidas, Dowsett *et al.* (2009) sugerem que estas não são associadas apenas com o aumento dos gases de efeito estufa, uma vez que as concentrações de  $CO_2$  atmosférico eram ligeiramente mais elevadas do que as do período pré-industrial (Raymo *et al.*, 1996). Entretanto, o aumento da temperatura neste período está relacionado com a especiação de representantes dos gêneros de águas rasas *Turbinaria* (*T. mesenterina* e *T. patula*) e *Tubastraea* (*T. falkineri* e *T. coccinea*), as quais possuem diferentes características ecológicas, zooxantelado e azooxantelado, respectivamente. Dessas, *T. coccinea* atualmente se destaca pelo seu alto potencial invasor, uma vez que é registrada se “espalhando” rapidamente pelo oeste do

oceano Atlântico, modificando comunidades bentônicas nativas e competindo com espécies de corais endêmicos (Lages *et al.*, 2011; Riul *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Desta forma, a origem do gênero *Tubastraea* no limite entre o Paleoceno e Eoceno (Cairns, 2001), quando as temperaturas eram extremamente altas devido ao MTPE, somada ao surgimento da *T. coccinea* durante um intervalo marcado por aquecimento global, sugerem que o poder competitivo de *T. coccinea* pode ser devido a sua adaptação às altas temperaturas. Assim, uma das consequências das rápidas mudanças climáticas que estamos presenciando, já ameaça não só o futuro das demais espécies de corais, mas de toda a fauna recifal, uma vez que, a invasão da *T. coccinea* se alastra rapidamente (Cairns, 2001), que por sua vez modifica as funções do ecossistema recifal devido à substituição de corais hermatípicos para espécies ahermatípicos (Santos *et al.*, 2013).

O Quartenário é marcado por diversas mudanças ambientais globais rápidas e abruptas associadas aos ciclos glaciais, como variações do nível do mar, da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e da temperatura. O efeito destas mudanças é refletido diretamente na hidrodinâmica e sedimentação nos recifais, determinando assim, a composição taxonômica dos corais nestes ecossistemas (Pandolfi, 1999). Durante o Quartenário, vários gêneros da família Dendrophylliidae foram originados: *Astroides* no Pleistoceno e *Thechopsammia*, *Bathypsammia*, *Endopsammia*, *Pourtalopsammia*, *Trochopsammia*, *Dichopsammia* no Holoceno (Figura 2). Entretanto, na presente reconstrução filogenética *A. calycularis* foi recuperada divergindo ca. 44 M.a. antes (no Eoceno médio), sugerindo assim, a origem anterior do gênero *Astroides* e que os registros fósseis dos seus representantes ainda não foram encontrados nas camadas sedimentares dos períodos anteriores.

Durante o Pleistoceno ocorreu o Último Máximo Glacial (UMG), o qual é caracterizado pela maior extensão de camadas de gelo do último período glacial (Clark *et al.*, 2009) e, consequentemente é responsável pela redução do nível do mar para cerca de 120 m abaixo do presente (Rohling *et al.*, 1998), afetando seriamente os recifes de corais, uma vez que diminuiu a área para colonização de espécies bentônicas, além do decréscimo no acúmulo de carbonato de cálcio para menos de 5-10% do que os valores atuais (Kleypas *et al.*, 1999). Logo após este evento, temos a formação de uma linhagem do gênero de azooxanteladas *Rhizopsammia* que ocorre exclusivamente em águas rasas (*R. wettsteini* e

*Rhizopsammia* sp.). Demonstrando assim, um processo evolutivo após um evento impactante aos recifes de corais.

Embora os dendrofilídeos tenham resistido a perturbações climáticas globais pretéritas, o futuro deles e dos demais corais escleractíneos é incerto frente às mudanças com magnitudes sem precedentes nos últimos 300 M.a. (Kiessling & Simpson, 2011), as quais, devido a sua velocidade, podem diminuir a oportunidade para processos adaptativos (Hughes *et al.*, 2003; Veron *et al.*, 2009). Atualmente, a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico excede 380 ppm, sendo este valor cerca de 80 ppm acima do valor mais alto dos últimos 740.000 anos (Petit *et al.*, 1999). Consequentemente, os oceanos estão mais quentes (+0.7°C), e o pH (-0.1 ph unid) e os íons de carbonato (~210 Mmol Kg<sup>-1</sup>) mais baixos se comparados aos últimos 420.000 anos (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007). Estas condições ambientais coincidem com o aumento da frequência e abundância de branqueamento, bem como com a redução da profundidade de saturação da aragonita (ASH), diminuição da complexidade recifal e da diversidade de espécies (Veron *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2012).

De maneira geral, considerando a relação entre as mudanças climáticas dos últimos 150 M.a. e a história evolutiva da família Dendrophylliidae, ou seja, os períodos geológicos em que foram recuperadas as principais divergência e especiação dos dendrofilídeos, provavelmente as perturbações ambientais relacionadas com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, da temperatura, dos eventos de branqueamento dos corais, da turbidez da água e a redução na quantidade de luz associada ao aumento da lâmina d'água podem proporcionar vantagem competitiva aos corais heterotróficos e que suportam melhor as variações da incidência de luz, ou seja, as espécies com os pólipos grandes, que sejam eficazes na captura de plâncton e independentes das zooxantelas (Freitas *et al.*, 2012). Desta forma, a capacidade diferenciada de adaptação às atuais mudanças climáticas destas espécies poderá alterar a estrutura da comunidade recifal, assim como é provável de ter ocorrido no limite entre o Paleoceno e o Eoceno.

As atuais mudanças climáticas somadas às pressões de origem antrópica também ameaçam os corais de mar profundo. Apesar deste ambiente já ter servido de “refugio” aos corais escleractíneos no passado (Kitahara *et al.*, 2010; Stolarski *et al.*, 2011) e ter sido colonizado durante períodos de condições ambientais extremas, como no final do Cretáceo e durante o MTPE, quando os recifes de regiões estavam

ausentes ou possuíam baixa deposição de carbonato. Embora algumas espécies solitárias sejam adaptadas a ambientes abaixo da ASH (e.g.: *Fungiacyathus marenzelleri*; *Leptopenus antarcticus*) e, conseqüentemente menos susceptíveis às mudanças no estado de saturação da água do mar do que as pertencentes a outros grupos, também poderão ser seriamente afetadas devido as rápidas variações no *pH* da água do mar previstas para os próximos séculos (Caldeira & Wickett, 2003). De forma geral, todos os organismos que secretam carbonato de cálcio serão possivelmente afetados com as mudanças climáticas globais contemporâneas, colocando em risco não só a sobrevivência dos corais escleractíneos, mas de uma grande parte da biodiversidade da Terra, como nunca antes experimentando na história da humanidade (Veron *et al.*, 2009).

#### 2.4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ECOLÓGICAS ANCESTRAIS

A reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada nos marcadores moleculares concatenados não recuperou um clado basal, desta forma não podemos inferir as características ecológicas e morfológicas ancestral. Entretanto, as azooxanteladas de oceano profundo *Dendrophyllia alcocki* e *Balanophyllia* sp. foram as primeiras espécies a divergir da linhagem mais profunda da família e, por isso, possivelmente o ancestral dos dendrofilídeos apresentava as mesmas características, i.e. eram azooxantelados e surgiram em oceano profundo. Desta forma, pelo menos três eventos de “invasão” para águas rasas podem ter ocorrido ao longo da história evolutiva da família. A origem de espécies em águas profundas e sua irradiação e diversificação em ambientes de águas rasas são documentados também para outros cnidários, como os corais moles pertencentes às ordens Alcyonacea (família Chrysogorgiidae) e Pennatulacea (Dolan, 2008; Pante *et al.*, 2012), os hidrozoários da família Stylanderidae (Lindner *et al.*, 2008), bem como para outros grupos taxonômicos, como as enguias (Inoue *et al.*, 2010) e gastrópodes (Smith & Thatje, 2012).

A heterogeneidade dos ecossistemas recifais de oceano profundo em combinação as poucas barreiras para a dispersão existentes neste ambiente (Grassle & Maciolek, 1992) promovem oportunidades para evolução e diversificação de espécies que posteriormente “invadem” outras regiões, incluindo ambientes de

águas rasas (Lindner *et al.*, 2008; Kiessling *et al.*, 2010). O deslocamento dos organismos marinhos entre estes dois ambientes (águas rasas e profundas) pode ocorrer durante eventos de transgressão/regressão do nível do mar, bem como durante períodos em que os oceanos são mais quentes, causando uma maior homogeneização das camadas d'água, possibilitando o movimento vertical de espécies (Cottin *et al.*, 2012; Pante *et al.*, 2012; Smith & Thatje, 2012). Entretanto, o deslocamento entre os ambientes de águas rasas e profundas é facilitada nos corais escleractíneos por não ser restrito aos seus estágios iniciais, podendo também as fases adultas de vida livre “invadirem” ambientes de diferentes profundidades (Cottin *et al.*, 2012). Desta forma, os corais escleractíneos solitários com modo de vida livre podem ser considerados potenciais “invasores”, quando em condições ambientais favoráveis à migração.

Estudos indicam que o sucesso dos corais no ambiente de água rasa deve-se a simbiose com as zooxantelas, uma vez que as algas simbióticas fornecem suprimento energético que os permitem prosperar em ambientes oligotróficos, bem como por adaptações morfológicas que se traduzem em um aumento da superfície coralínea exposta a luz (Stanley, 2003; Hallock, 2005; Barbeitos *et al.*, 2010; Stanley & Helmle, 2010). Além disso, a aquisição da simbiose provavelmente facilitou a migração de representantes da família Dendrophylliidae do oceano profundo para águas rasas, uma vez que *Heteropsammia cochlea* que possui simbiose facultativa (Cairns, 1999), foi recuperada no primeiro clado a apresentar espécies no ambiente de águas rasas. Somado a isso, embora a presente análise não tenha resolvido a morfologia do ancestral da família (i.e. solitário ou colonial), registros fósseis indicam que a forma de crescimento do primeiro representante colonial de Dendrophylliidae (*Blastozopsammia*) é análogo ao de espécies zooxanteladas construtoras de recifes (e.g.: *Acropora*) (Filkorn & Alor, 2004). Assim, a colonialidade nos representantes da família provavelmente apareceu após a aquisição da simbiose com as zooxantelas.

Apesar da condição simbiótica e do habitat dos prováveis ancestrais de Dendrophylliidae (i.e. azooxantelado e de oceano profundo) não serem os mesmos de seu grupo irmão Poritidae (i.e. exclusivamente zooxantelado e de água rasa), em reconstruções filogenéticas da ordem, os clados recuperados próximos a Dendrophylliidae e Poritidae são azooxantelados (Stolarski *et al.*, 2011). Desta forma, a presente topologia é consistente com a hipótese de ancestralidade de um

Dendrophylliidae azooxantelado solitário e com a possibilidade de múltiplas transições entre o ambiente de águas rasas e profundas (Cairns, 2001; Kitahara *et al.*, 2010). Entretanto, apesar desta hipótese não corroborar a proposta por Arrigoni *et al.* (2014), i.e. ancestral colonial e ocorrência de pelo menos três reversões independentes deste estado para o solitário ao longo da história evolutiva da família, a origem do estado solitário antes do colonial em representantes da família é consistente com os registros fósseis de dendrofilídeos (ver Cairns, 2001; Filkorn & Alor, 2004). De modo geral, a maioria dos gêneros da família (existentes e fósseis) são conhecidos a partir do Cenozóico, e as poucas espécies da família conhecidas do Mesozóico são solitárias e originadas no Cretáceo, com exceção da colonial *Blastozopsammia* que surgiu nos registros fósseis 27 M.a após os primeiros dendrofilídeos solitários (Filkorn & Alor, 2004).

## 2.5 CONCLUSÃO

A reconstrução filogenética com base nos marcadores mitocondriais (16S rDNA e CO1) e nuclear (28S rDNA) concatenados suporta a monofilia dos dendrofilídeos. Contudo a vasta maioria dos gêneros da família estabelecidos através de caracteres morfológicos foram recuperados como polifiléticos, sendo apenas *Tubastraea*, *Enallopsammia* e *Rhizopsammia* provavelmente monofiléticas. Registros fósseis indicam que os dendrofilídeos surgiram no início do Cretáceo (ca. 127 M.a.) quando as condições ambientais não eram favoráveis aos escleractíneos. Apesar de não ter sido recuperado um clado basal na reconstrução filogenética, os dendrofilídeos ancestrais eram provavelmente solitários, azooxantelados e se originaram em oceano profundo. Em adição, ao longo da história evolutiva da família, em ao menos três oportunidades houveram “invasões” a ambientes de águas rasas.

A migração do ambiente profundo para raso ocorreu provavelmente em períodos de variação do nível do mar, sendo que a aquisição da simbiose com zooxantelas foi um advento facilitador durante estas transições. Mesmo as condições ambientais extremas ao longo da história evolutiva da família Dendrophylliidae terem possivelmente condicionado processos evolutivos, as variações climáticas atuais se caracterizam, de forma geral, como um risco para os

corais, uma vez que as mesmas se desenvolvem em velocidades significativamente maiores do que as dos últimos milhões de anos, dificultando assim a adaptação das espécies.

As análises dos marcadores moleculares mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e nuclear (28S rDNA) foram bem sucedidas ao gerar dados com alta resolução filogenética, corroboraram a monofilia dos dendrofilídeos, além de, com a correlação da reconstrução filogenética com as mudanças climáticas globais dos últimos 150 M.a., forneceram informações sobre as prováveis causas das divergências da família. Entretanto, a filogenia da família Dendrophylliidae ainda não foi resolvida, ocorrendo ainda discrepância entre as análises morfológicas (taxonomia clássica) e moleculares, uma vez que muitos gêneros foram recuperados como polifiléticos e algumas espécies possuem altas distâncias genéticas entre seus espécimes. Desta forma, são necessários mais estudos, compreendendo um maior número de representantes por gênero, além de espécies pertencentes aos 5 gêneros não contemplados em nossas análises devido ao reduzido número de exemplares ou a preservação de forma inadequada para análises moleculares. Adicionalmente, para uma maior resolução filogenética, sugerimos a aplicação de técnicas moleculares atualmente mais avançadas na área de genética, como o sequenciamento de nova geração, o qual fornecerá uma gama de informações muito maior do genoma destes organismos para serem aplicados em análises filogenéticas, bem como estudos com base em análises do DNA ancestral, aplicado em fósseis.



Tabela 4: Lista de espécies e das estações de coletas

Espécie		Expedição		Oceano Local		Latitude	Longitude	Prof (m)	Data
# NMNH									
1	<i>Thecopsammia socialis</i> Pourtaès, 1868	NA	FL	28°19'N	79°45'W	393-462	11/05		
2	<i>Endopachys grayi</i> Milne Edwards & Haime, 1848	PN	HI	20°29'N	156°40'W	150	10/06		
3	<i>Rhizopsammia</i> sp.	PN	HI	24°49'N	167°52'W	211	10/11		
4	<i>Enallopsammia rostrata</i> (Pourtaès, 1878)	PN	HI	25°38'N	169°19'W	512	10/03		
5	<i>Enallopsammia profunda</i> (Pourtaès)	PN	FL	30°48'N	79°38'W	534-529	11/05		
6	<i>Dendrophyllia alternata</i> Pourtaès, 1880	NA	MA	12°08'N	68°18'W	337	05/00		
7	<i>Dendrophyllia velata</i> Crossland, 1952	PN	PW	7°16'N	134°31'E	134	03/01		
8	<i>Eguchipsammia serpentina</i> (Vaughan, 1907)	PN	HI	28°50'N	178°53'W	264	09/03		
9	<i>Bathypsammia fallosocialis</i> Squires, 1959	NA	NC	31°46'N	79°12'W	507	10/05		
10	<i>Balanophyllia elegans</i> Verrill, 1864	PN	WA	48°24'N	124°40'W	93	05/06		
11	<i>Cladopsammia manuelensis</i> (Chevalier, 1966)	NA	MA	12°10'N	69°08'W	330	05/00		
# MNHN									
12	<i>Dendrophyllia arbuscula</i> van der Horst, 1922	PS	NC	20°20'S	158°45'E	358-374	11/05		
13	<i>Dendrophyllidea</i> spp. 1	PS	NC	10°21'S	158°40'E	440-505	11/05		
14	<i>Dendrophyllidea</i> spp. 2	PS	NC	22°17'S	159°28'E	490	11/05		
15	<i>Dendrophyllidea</i> spp. 3	PS	NC	20°21'S	158°43'E	390-394	11/05		
16	<i>Dendrophyllidea</i> spp. 4	PS	NC	19°33'S	158°40'E	393-396	11/05		
17	<i>Dendrophyllidea</i> spp. 5	PS	NC	19°33'S	158°40'E	400-413	11/05		
# CEBIMar									
18	<i>Tubastraea</i> Lesson, 1829	AS	SP	23°48'S	45°24'W	3	07/13		
19	<i>Tubastraea tagusensis</i> Wells, 1982	AS	SP	23°48'S	45°24'W	3	07/13		
20	<i>Dendrophyllia</i> sp.	AS	SP	23°48'S	45°24'W	3	07/13		
# UMB									
21	<i>Astroides calycularis</i> (Pallas, 1766)	OI	*	*	*	*	*		
22	<i>Balanophyllia europaea</i> (Risso, 1826)	OI	*	*	*	*	*		

Espécie	Expedição	Oceano	Local	Latitude	Longitude	Prof (m)	Data
23 <i>Balanophyllia imperialis</i> Kent, 1871		OI	*	*	*	*	*
24 <i>Cladopsammia eguchii</i> (Wells, 1982)		OI	*	*	*	*	*
25 <i>Cladopsammia gracilis</i> (Milne Edwards and Haime, 1848)		OI	*	*	*	*	*
26 <i>Dendrophyllia corrigera</i> (Lamarck, 1816)		OI	*	*	*	*	*
27 <i>Dendrophyllia</i> sp1.		OI	*	*	*	*	*
28 <i>Duncanopsammia axituga</i> (Milne-Edwards & Haime, 1848)		OI	*	*	*	*	*
29 <i>Eguchipsammia</i> sp1.		OI	*	*	*	*	*
30 <i>Heteropsammia cochlea</i> (Spengler 1781)		OI	*	*	*	*	*
31 <i>Leptopsammia pruvoti</i> (Lacaze-Duthiers, 1897)		OI	*	*	*	*	*
32 <i>Rhizopsammia verrilli</i> van der Horst, 1922		OI	*	*	*	*	*
33 <i>Rhizopsammia wettsteini</i> Scheer & Pillai, 1983		OI	*	*	*	*	*
34 <i>Tubastrea</i> cf <i>T. aurea</i> (Quoy y Gaimard, 1830)		OI	*	*	*	*	*
35 <i>Tubastrea micranthus</i> (Ehrenberg, 1834)		OI	*	*	*	*	*
36 <i>Turbinaria heronensis</i> Wells, 1958		OI	*	*	*	*	*
37 <i>Turbinaria mesenterina</i> (Lamarck, 1816)		OI	*	*	*	*	*
38 <i>Turbinaria patula</i> (Dana, 1846)		OI	*	*	*	*	*
39 <i>Turbinaria reniformis</i> (Bernard, 1896)		OI	*	*	*	*	*

AN: Atlântico Norte, AS: Atlântico Sul, PN: Pacífico Norte, PS: Pacífico Sul, OI: Oceano Índico, MA: Mar do Caribe, PW: Palau, SP: São Paulo, HI: Hawaii, FL: Florida, WA: Washington, NC: Carolina do Norte, \* os dados estão sendo recuperados.

Tabela 5: Lista das espécies utilizadas nas análises filogenéticas para os marcadores moleculares mitocondriais (CO1 e 16S rDNA) e o nuclear (28S rDNA), bem como para a concatenação destes *locus*; onde “gb” indica a referência de busca do GenBank e “Conc.” representa a concatenação dos genes.

n	Táxon	Amostra	gb	Coleção/ origem	CO1	28S	16S	Conc.
1	<i>Astroides calycularis</i>		AF549248.1			1		
2	<i>Astroides calycularis</i>	MD843		Itália	1	1	1	1
3	<i>Balanophyllia cf. dentata</i>	K178	HQ439646.1			1		
4	<i>Balanophyllia dentata</i>	K178	HM018611.1		1			
5	<i>Balanophyllia cornu</i>	K172		Austrália		1		
6	<i>Balanophyllia cornu</i>	K148	HM018605.1		1			
7	<i>Balanophyllia cornu</i>	K148	HQ439647.1			1		
8	<i>Balanophyllia desmophylloides</i>	K141		Austrália	1			
9	<i>Balanophyllia desmophylloides</i>	K66	HQ439648.1			1		
10	<i>Balanophyllia desmophylloides</i>	K66	HM018607.1		1			
11	<i>Balanophyllia desmophylloides</i>	K90	HM018608.1		1			
12	<i>Balanophyllia elegans</i>		DQ445805.1		1			
13	<i>Balanophyllia europaea</i>	SOL4		Itália	1	1	1	1
14	<i>Balanophyllia europaea</i>		AF549220.1			1		
15	<i>Balanophyllia gigas</i>	47		Paris	1	1	1	1
16	<i>Balanophyllia gigas</i>	K98	HM018609.1		1			
17	<i>Balanophyllia gigas</i>	K98		Austrália		1		
18	<i>Balanophyllia imperialis</i>	NC838		Itália	1	1	1	1
19	<i>Balanophyllia laysanensis</i>	51		Paris	1			
20	<i>Balanophyllia regia</i>	SOL3		Itália	1	1	1	1
21	<i>Balanophyllia regia</i>		EU262813.1			1		
22	<i>Balanophyllia regia</i>		AF549221.1			1		
23	<i>Balanophyllia sp.</i>	k56		Austrália		1		
24	<i>Balanophyllia sp.</i>	k56	HM018606.1		1			
25	<i>Balanophyllia sp.</i>	k57		Austrália	1	1		
26	<i>Balanophyllia sp.</i>	K60		Austrália	1			
27	<i>Balanophyllia sp.</i>	K61		Austrália	1	1		
28	<i>Balanophyllia sp.</i>	K99		Austrália		1		
29	<i>Balanophyllia sp.</i>	K99	HM018610.1		1			
30	<i>Balanophyllia sp.</i>	K200		Austrália	1	1		
31	<i>Balanophyllia sp.</i>	K289		Austrália	1			
32	<i>Balanophyllia sp.</i>	K290		Austrália	1		1	
33	<i>Balanophyllia sp.</i>	K291B		Austrália	1	1	1	1
34	<i>Balanophyllia sp.</i>	K294		Austrália	1	1	1	1
35	<i>Balanophyllia sp.</i>	K295A		Austrália	1	1	1	1
36	<i>Balanophyllia sp.</i>	K296		Austrália	1			
37	<i>Balanophyllia sp.</i>	K299		Austrália	1			
38	<i>Balanophyllia sp.</i>	K300A		Austrália		1	1	
39	<i>Balanophyllia sp.</i>	K301		Austrália	1		1	
40	<i>Balanophyllia sp.</i>	K302		Austrália	1			

n	Táxon	Amostra	gb	Coleção/ origem	CO1	28S	16S	Conc.
41	<i>Balanophyllia</i> sp.	K332		Austrália	1		1	
42	<i>Balanophyllia</i> sp.	6		Washington	1		1	
43	<i>Balanophyllia</i> sp.		EU262855.1			1		
44	<i>Balanophyllia</i> sp.		HQ439653.1			1		
45	<i>Balanophyllia</i> sp.		HQ439652.1			1		
46	<i>Balanophyllia</i> sp.	92		Nova Zelândia	1	1	1	1
47	<i>Balanophyllia</i> sp. Nov.	K158		Austrália	1	1		
48	<i>Balanophyllia</i> sp. Nov.		HQ439651.1			1		
49	<i>Bathypsammia fallosocialis</i>	3		Washington	1		1	
50	<i>Cladopsammia echinata</i>	48		Paris	1		1	
51	<i>Cladopsammia echinata</i>	49		Paris	1	1	1	1
52	<i>Cladopsammia eguchii</i>	MQ002		Itália	1	1	1	1
53	<i>Cladopsammia gracilis</i>		EU262774.1			1		
54	<i>Cladopsammia manuelensis</i>	7		Washington	1		1	
55	<i>Dendrophyllia alcocki</i>	K307B		Austrália	1	1	1	1
56	<i>Dendrophyllia alternata</i>		AF550366.1					
57	<i>Dendrophyllia arbuscula</i>	46		Paris	1	1	1	1
58	<i>Dendrophyllia cornigera</i>	CAN01		Itália	1	1	1	1
59	<i>Dendrophyllia gracilis</i>		AF265588.1					
60	<i>Dendrophyllia velata</i>	4		Washington	1		1	
61	<i>Dendrophyllia</i> sp.		AB441239.1		1			
62	<i>Dendrophyllia</i> sp.	44		Japão	1		1	
63	<i>Dendrophylliidae</i> spp.	73			1	1		
64	<i>Dendrophylliidae</i> spp.	94		Nova Zelândia	1		1	
65	<i>Duncanopsammia axifuga</i>	KT56		Itália	1	1	1	1
66	<i>Duncanopsammia axifuga</i>	V196		Austrália	1		1	
67	<i>Eguchipsammia japonica</i>	91		Nova Zelândia	1	1	1	1
68	<i>Eguchipsammia serpentina</i>	HS3134		Itália	1	1	1	1
69	<i>Eguchipsammia serpentina</i>	13		Washington	1		1	
70	<i>Eguchipsammia</i> sp.	90		Nova Zelândia	1	1	1	1
71	<i>Enallopsammia marenzelleri</i>	89		Nova Zelândia	1	1	1	1
72	<i>Enallopsammia profunda</i>	10		Washington	1			
73	<i>Enallopsammia rostrata</i>	78			1			
74	<i>Enallopsammia rostrata</i>	8		Washington	1		1	
75	<i>Enallopsammia rostrata</i>	K48	HM018632.1	Austrália	1			
76	<i>Enallopsammia rostrata</i>	K48	HQ439654.1	Austrália		1		
77	<i>Enallopsammia rostrata</i>	k59		Austrália		1		
78	<i>Endopachys grayi</i>	K218A		Austrália	1			
79	<i>Endopachys grayi</i>	K218A	HQ439655.1	Austrália		1		
80	<i>Endopachys grayi</i>	86		Nova Zelândia	1	1		
81	<i>Heteropsammia cochlea</i>	14		Itália	1	1	1	1

n	Táxon	Amostra	gb	Coleção/ origem	CO1	28S	16S	Conc.
82	<i>Heteropsammia</i> sp.		EU262866.1			1		
83	<i>Leptopsammia pruvoti</i>	MD03		Itália	1	1	1	1
84	<i>Leptopsammia pruvoti</i>		EU262851.1			1		
85	<i>Porites cylindrica</i>	V271		Austrália	1	1		
86	<i>Porites lobata</i>	V187		Austrália	1	1	1	1
87	<i>Porites rus</i>	V86		Austrália	1	1	1	1
88	<i>Rhizopsammia verrilli</i>	NC839		Itália	1	1	1	1
89	<i>Rhizopsammia wettsteini</i>	M765		Itália	1	1	1	1
90	<i>Rhizopsammia</i> sp.	V291		Austrália	1	1	1	1
91	<i>Thecopsammia socialis</i>	11		Washington	1			
92	<i>Thecopsammia</i> sp.	50		Washington	1			
93	<i>Tubastraea aurea</i>	SO119		Itália	1	1	1	1
94	<i>Tubastraea aurea</i>		JQ920444.1		1			
95	<i>Tubastraea aurea</i>		AB441237.1		1			
96	<i>Tubastraea aurea</i>		AB441236.1		1			
97	<i>Tubastraea aurea</i>		AB441235.1		1			
98	<i>Tubastraea coccinea</i>		DQ445807.1		1			
99	<i>Tubastraea coccinea</i>		DQ445806.1		1			
100	<i>Tubastraea coccinea</i>	6		Brasil	1		1	
101	<i>Tubastraea coccinea</i>		EU262864.1			1		
102	<i>Tubastraea coccinea</i>		EU262854.1			1		
103	<i>Tubastraea faulkneri</i>	V95		Austrália	1	1	1	1
104	<i>Tubastraea micranthus</i>	Y756		Itália	1	1	1	1
105	<i>Tubastraea micranthus</i>		AF549219.1			1		
106	<i>Tubastraea micranthus</i>	V250		Austrália	1	1	1	1
107	<i>Tubastraea tagusensis</i>	43		Brasil	1	1	1	1
108	<i>Tubastraea</i> sp.	MY105		Itália	1	1	1	1
109	<i>Tubastraea</i> sp.	NC841		Itália	1	1	1	1
110	<i>Tubastraea</i> sp.		AB441238.1		1			
111	<i>Tubastraea</i> sp.	V297		Austrália	1			
112	<i>Turbinaria bifrons</i>	V286		Austrália	1	1	1	1
113	<i>Turbinaria heronensis</i>	HS2178		Itália	1		1	
114	<i>Turbinaria irregularis</i>		JQ966136.1			1		
115	<i>Turbinaria mesenterina</i>	V120		Austrália	1			
116	<i>Turbinaria mesenterina</i>	BA124		Itália		1	1	
117	<i>Turbinaria patula</i>	HS2283		Austrália	1	1	1	1
118	<i>Turbinaria peltata</i>	V236		Austrália	1		1	
119	<i>Turbinaria peltata</i>		AB907100.1		1			
120	<i>Turbinaria peltata</i>		AB907101.1		1			
121	<i>Turbinaria peltata</i>		AB907099.1		1			
122	<i>Turbinaria peltata</i>		AB441240.1		1			
123	<i>Turbinaria peltata</i>		EU262799.1			1		
124	<i>Turbinaria peltata</i>		JQ966131.1			1		
125	<i>Turbinaria peltata</i>	NC633		Itália		1		

n	Táxon	Amostra	gb	Coleção/ origem	CO1	28S	16S	Conc.
126	<i>Turbinaria reniformis</i>	BA126		Itália	1	1	1	1
127	<i>Turbinaria reniformis</i>	V197		Austrália	1			
128	<i>Turbinaria stellulata</i>	V165		Austrália	1	1		
<b>Total</b>					<b>96</b>	<b>74</b>	<b>54</b>	<b>36</b>

## 2.6 ANEXOS

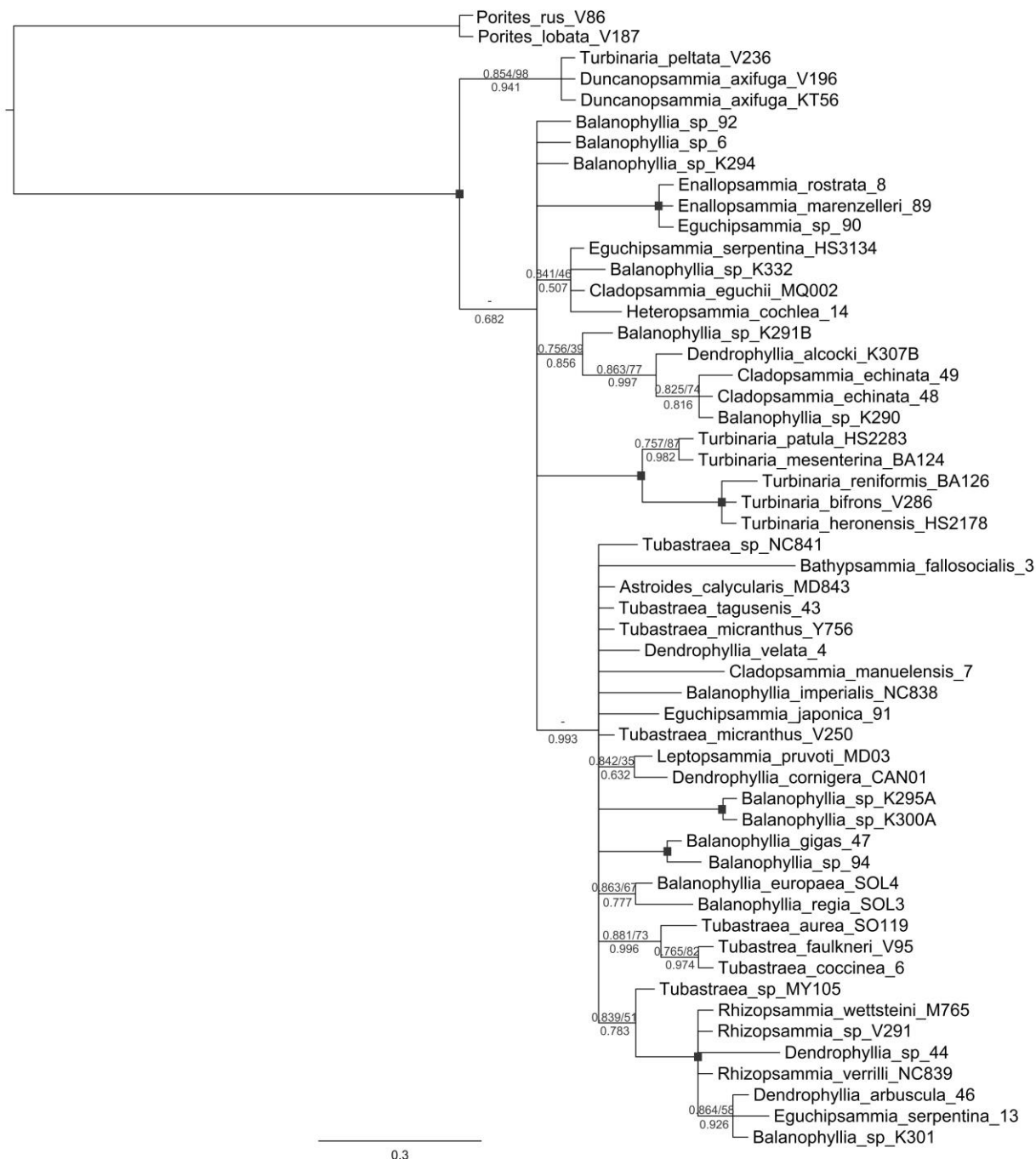


Figura 9: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae por inferência bayesiana, baseada no marcador mitocondrial ribossomal longo (16S rDNA). Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e a probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e MrBayes, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0.995$ ,  $\geq 0.75$  e  $\geq 0.995$ , respectivamente).

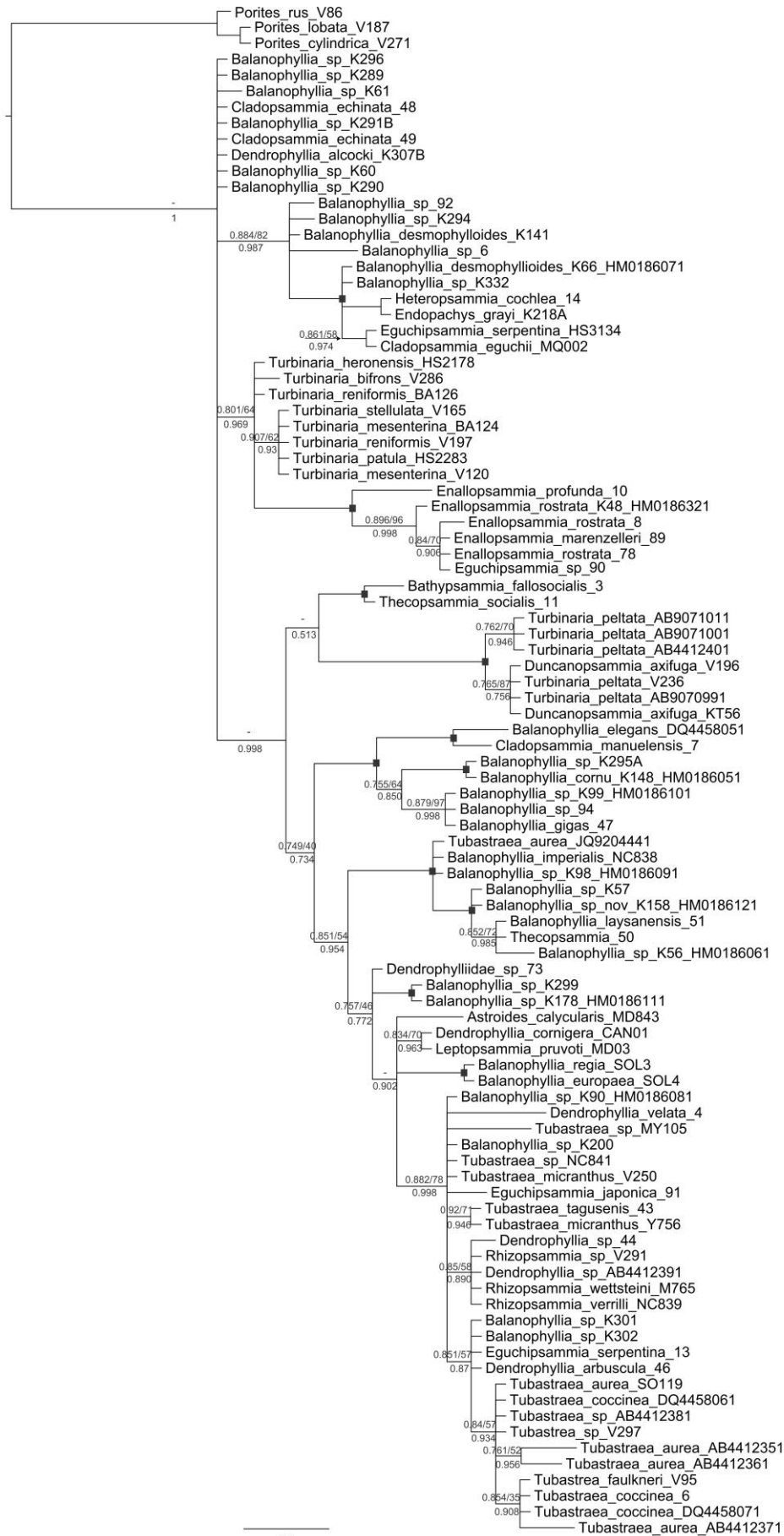




Figura 10: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae por inferência bayesiana baseada no marcador Citocromo Oxidase subunidade 1 (CO1). Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e a probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e MrBayes, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente).

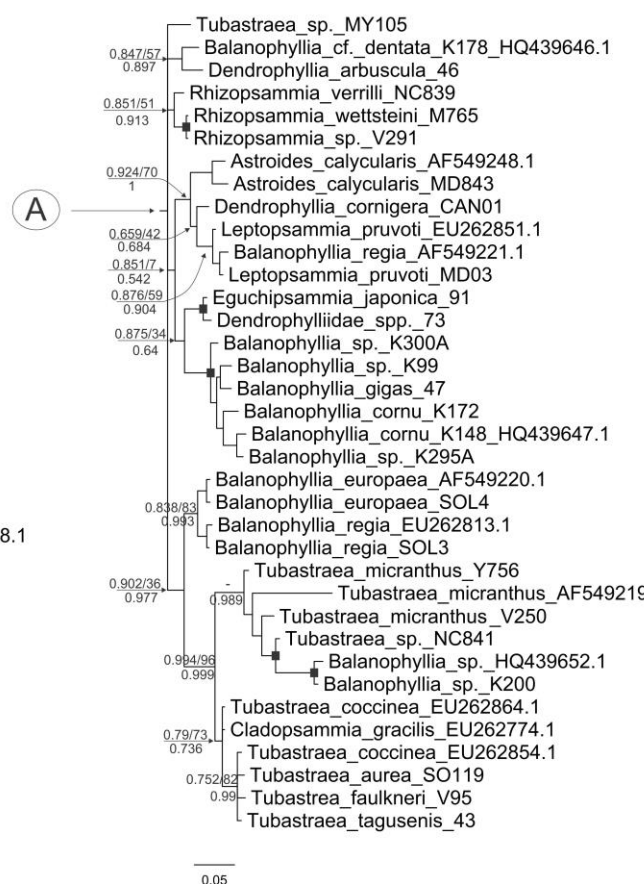
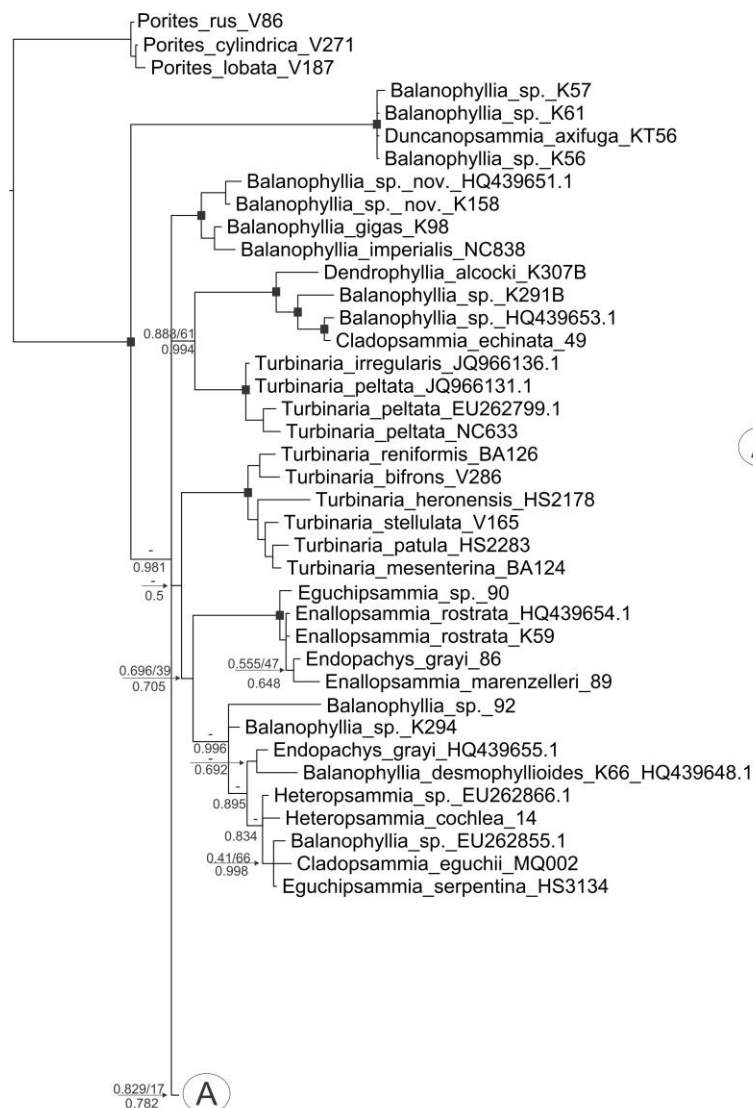


Figura 11: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada na inferência bayesiana do marcador ribossomal nuclear 28S. Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e a probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e MrBayes, respectivamente. Os quadrados pretos nos nós dos ramos indicam clados com alto valor de suporte (sh-like, bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 0,995$ , 75 e 0,995, respectivamente).

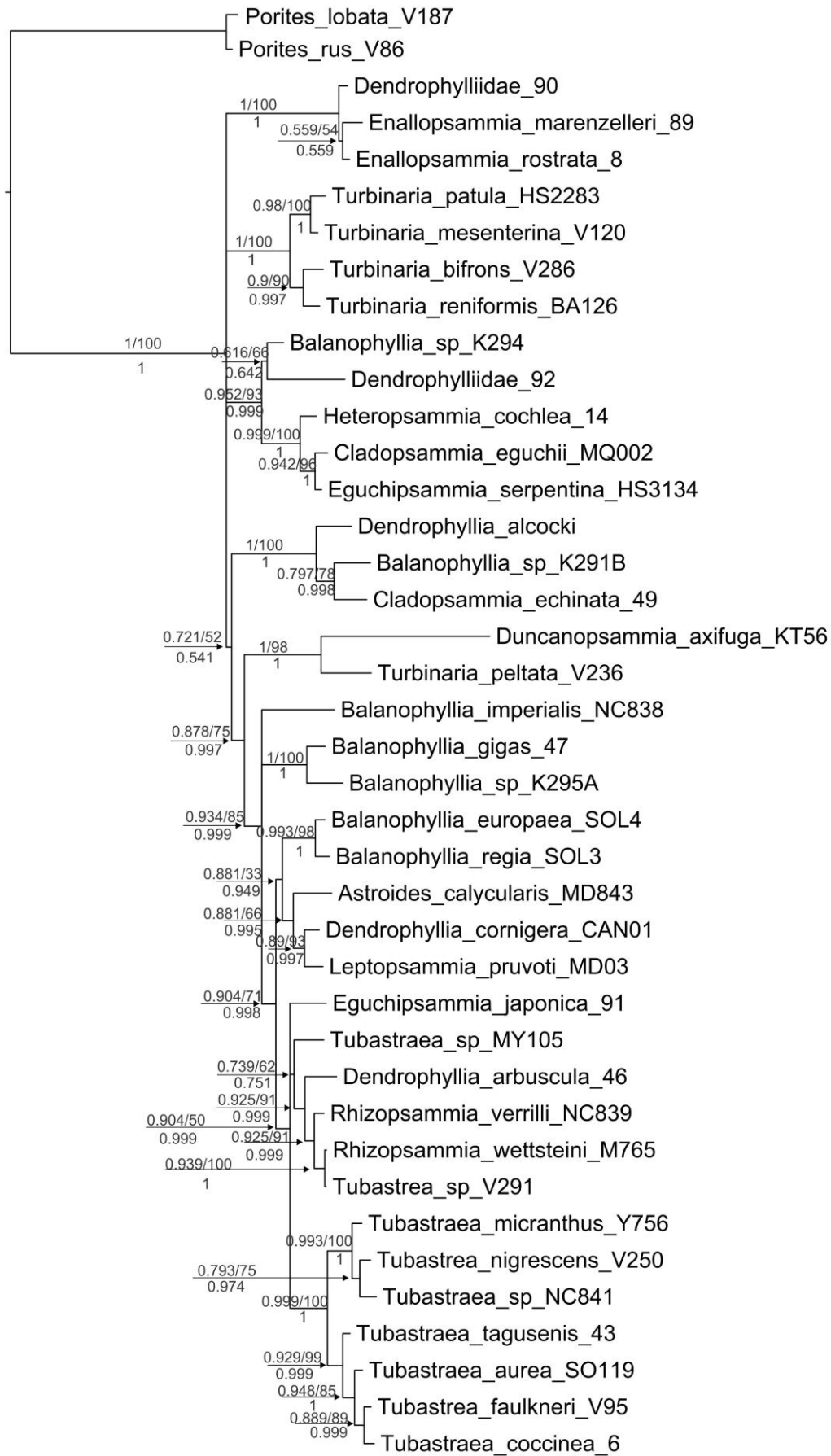


Figura 12: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada em Inferência Bayesiana do concatenamento dos marcadores mitocondriais CO1 e 16S rDNA, e nuclear 28S rDNA. Os números nos ramos indicam o suporte sh-like e o valor de bootstrap (acima), e probabilidade posterior (abaixo) calculados usando o PhyML e Mrbayes, respectivamente.

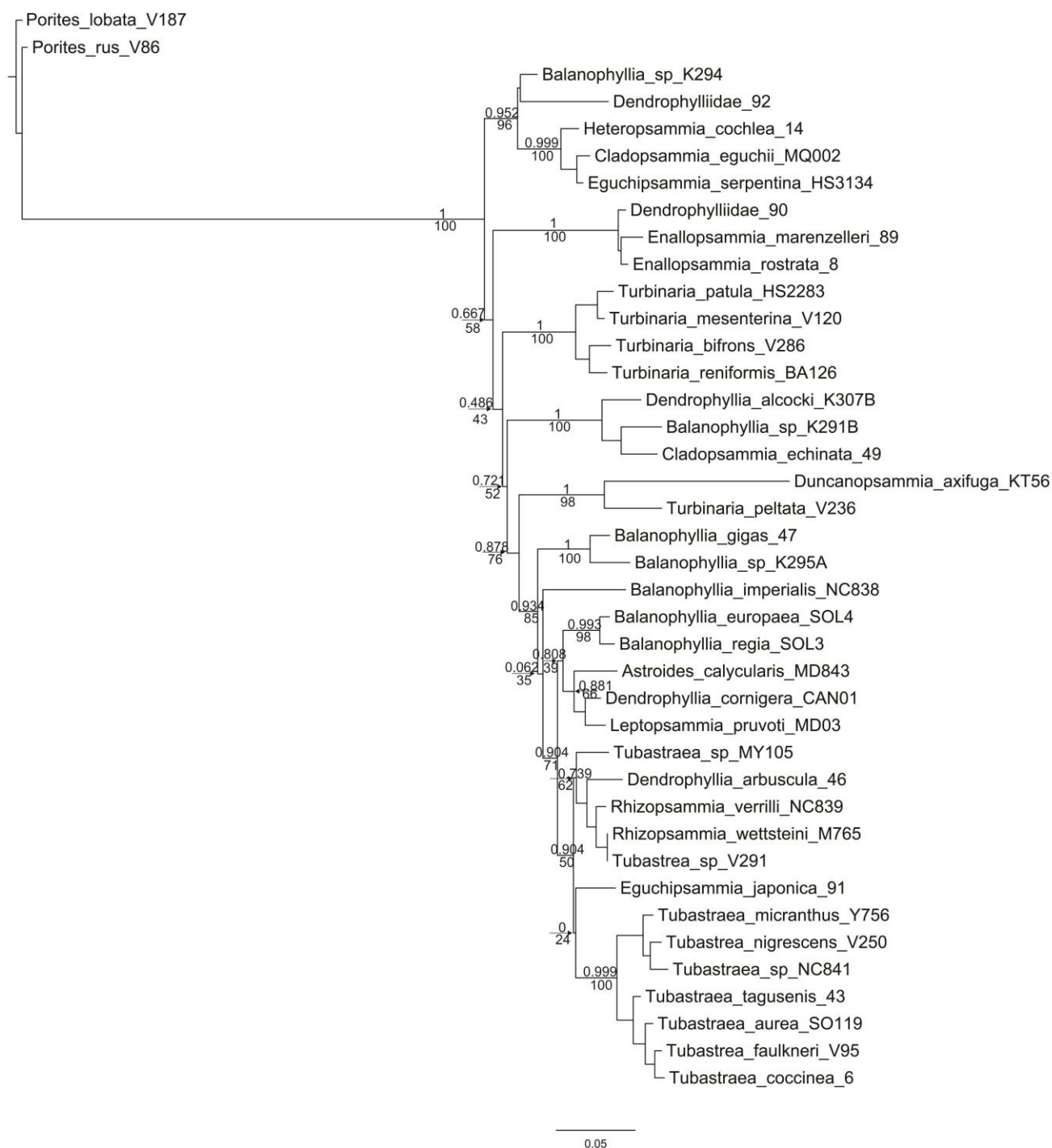


Figura 13: Reconstrução filogenética da família Dendrophylliidae baseada na análise de máxima verossimilhança do concatenamento dos marcadores mitocondriais CO1 e 16S rDNA, e nuclear 28S rDNA. Os números nos ramos indicam o suporte sh-like (acima) e o valor de bootstrap (abaixo) calculados usando o PhyML.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrigoni, R., Kitano, Y.F., Stolarski, J., Hoeksema, B.W., Fukami, H., Stefani, F., *et al.* 2014. A phylogeny reconstruction of the Dendrophylliidae (Cnidaria, Scleractinia) based on molecular and micromorphological criteria, and its ecological implications. *Zool. Scr.* 1–28.
- Baceta, J.I., Pujalte, V. & Bernaola, G. 2005. Paleocene corallgal reefs of the western Pyrenean basin, northern Spain: New evidence supporting an earliest Paleogene recovery of reefal ecosystems. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **224**: 117–143.
- Barbeitos, M.S., Romano, S.L. & Lasker, H.R. 2010. Repeated loss of coloniality and symbiosis in scleractinian corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 11877–82.
- Baron-Szabo, R.C. 2008. Corals of the K/T-boundary: Scleractinian corals of the subordens Dendrophylliina, Caryophylliina, Fungiina, Microsolenina, and Stylinina. *Zootaxa* 1–244.
- Barron, E.J. 1983. A warm , equable Cretaceous: the nature of the problem. **19**: 305–338.
- Barron, E.J. 1985. Explanations of the tertiary global cooling trend. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **50**: 45–61.
- Beagley, C.T., Okimoto, R. & Wolstenholme, D.R. 1998. The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genet. Soc. Am.* **148**: 1091–1108.
- Bernecker, M. & Weidlich, O. 1990. The Danian (Paleocene) coral limestone of fakse, denmark: A model for ancient aphotic, azooxanthellate coral mounds. *Facies* **22**: 103–137.
- Berner, R.A. 1994. GEOCARB II; a revised model of atmospheric CO<sub>2</sub> over Phanerozoic time. *Am. J. Sci.* **294**: 56–91.
- Bijlsma, R. & Loeschcke, V. 2005. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J. Evol. Biol.* **18**: 744–9.
- Bilewitch, J.P. & Degnan, S.M. 2011. A unique horizontal gene transfer event has provided the octocoral mitochondrial genome with an active mismatch repair gene that has potential for an unusual self-contained function. *BMC Evol. Biol.* **11**: 228. BioMed Central Ltd.
- Bridge, D., Cunningham, C.W., Schierwater, B., DeSalle, R. & Buss, L.W. 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 8759–8753.
- Brugler, M.R. & France, S.C. 2007. The complete mitochondrial genome of the black coral *Chrysopathes formosa* (Cnidaria:Anthozoa:Antipatharia) supports classification of antipatharians within the subclass Hexacorallia. *Mol. Phylogenet. Evol.* **42**: 776–88.
- Brugler, M.R. & France, S.C. 2008. The mitochondrial genome of a deep-sea bamboo coral (Cnidaria, Anthozoa, Octocorallia, Isididae): Genome structure and putative origins of replication are not conserved among octocorals. *J. Mol. Evol.* **67**: 125–136.
- Budd, A.F. 2000. Diversity and extinction in the Cenozoic history of Caribbean reefs. **19**: 25–35.

- Buddemeier, R.W., Kleypas, J.A. & Aronson, R.B. 2004. Coral reefs & global climate change: potential contributions of climate change to stresses on coral reef ecosystems.
- Cairns, S.D. 2001. A generic revision and phylogenetic analysis of the Dendrophylliidae (Cnidaria: Scleractinia). *Smithson. Contrib. to Zool.* 1–48.
- Cairns, S.D. 1991. A revision of the ahermatypic Scleractinia of the Galapagos and Cocos Islands. *Smithson. Contrib. to Zool.* **504**: 1–32.
- Cairns, S.D. 2007. Deep-Water Corals : an overview with special reference to Diversity and Distribution of deep-water scleractinian corals. *Bull. Mar. Sci.* **81**: 311–322.
- Cairns, S.D. 1994. Scleractinia of the temperate North Pacific. *Smithson Contrib Zool* **557**: 1–150.
- Cairns, S.D. 1999. Species richness of recent Scleractinia. *Atoll Res. Bull.* **459**: 1–46.
- Caldeira, K. & Wickett, M.E. 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* **425**: 365.
- Castric-Fey, A. 1996. Le scléractiniaire *Dendrophyllia cornigera* en eau peu profonde, à Ouessant (Bretagne, Atlantique NE) en l'absence de barrière thermique. *Oceanol. Acta* **19**: 665–671.
- Cetean, C.G., Balç, R., Kaminski, M.A. & Filipescu, S. 2011. Integrated biostratigraphy and palaeoenvironments of an upper Santonian e upper Campanian succession from the southern part of the Eastern Carpathians, Romania. *Cretac. Res.* **32**: 575–590.
- Chaix, C. & Cahuzac, B. 2001. Une faune inédite de coraux scléractiniaires dans le gisement chattien d'Escornebéou (Landes, SW France ); stratigraphie, systématique et paléoécologie. *Ann. Paleontol.* **87**: 3–47.
- Chen, C., Chiou, C.Y., Dai, C.F. & Chen, C.A. 2008. Unique mitogenomic features in the scleractinian family pocilloporidae (Scleractinia: Astrocoeniina). *Mar. Biotechnol.* **10**: 538–553.
- Chen, C., Dai, C.F., Plathong, S., Chiou, C.Y. & Chen, C.A. 2008. The complete mitochondrial genomes of needle corals, *Seriatopora* spp. (Scleractinia: Pocilloporidae): An idiosyncratic atp8, duplicated trnW gene, and hypervariable regions used to determine species phylogenies and recently diverged populations. *Mol. Phylogenet. Evol.* **46**: 19–33.
- Chen, C.A., Wallace, C.C. & Wolstenholme, J. 2002. Analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. *Mol. Phylogenet. Evol.* **23**: 137–49.
- Chuang, Y. & Chen, C.A. 2015. The complete mitochondrial genomes of *Pseudosiderastrea* spp (Cnidaria, Scleractinia, Siderastreidae). *Mitochondrial DNA* **00**: 1–2. Informa UK Ltd.
- Ciarapica, G. & Passeri, L. 1993. An Overview of the Maldivian coral reefs in Felidu and North Malé Atoll ( Indian Ocean ): platform drowning by ecological crises. *Erlangen* **28**: 33–65.
- Clark, P.U., Dyke, A.S., Shakun, J.D., Carlson, A.E., Clark, J., Wohlfarth, B., *et al.* 2009. The Last Glacial Maximum. *Science* **325**: 710–714.
- Coffroth, M.A. & Santos, S.R. 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* **156**: 19–34.
- Cottin, D., Brown, A., Oliphant, A., Mestre, N.C., Ravaux, J., Shillito, B., *et al.* 2012. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Sustained hydrostatic pressure tolerance of the shallow water shrimp *Palaemonetes varians* at

- different temperatures : Insights into the colonisation of the deep sea. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **162**: 357–363. Elsevier Inc.
- Cuif, J., Lecointre, G., Tillier, A., Tillier, S. & Perrin, C. 2003. Patterns of septal biomineralization in Scleractinia compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. *Zool. Scr.* **32**: 459–473.
- Cuif, J.P., Dauphin, Y., Freiwald, A., Gautret, P. & Zibrowius, H. 1999. Biochemical markers of zooxanthellae symbiosis in soluble matrices of skeleton of 24 Scleractinia species. **123**: 269–278.
- Culver, S. & Rawson, P.F. 2000. *Biotic Response to Global Change: The Last 145 Million Years*, Culver, S. Cambridge.
- D'Hondt, S. 2015. Consequences of the Cretaceous/Paleocene mass extinction for marine ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **36**: 295–317.
- Daly, M., Brugler, M.R., Cartwright, P., Collins, A.G., Dawson, M.N., Fautin, D.G., *et al.* 2007. The phylum Cnidaria : A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus \*. *Zoo* **1668**: 127–182.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **9**: 772.
- Davies, A.J. & Guinotte, J.M. 2011. Global habitat suitability for framework-forming cold-water corals. *PLoS One* **6**: e18483.
- Davies, P.S. 1984. The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*\*. *Coral Reefs* **2**: 181–186.
- Del Río-Portilla, M. a, Vargas-Peralta, C.E., Paz-García, D. a, De La Cruz, F.L., Balart, E.F. & García-de-León, F.J. 2014. The complete mitochondrial DNA of endemic Eastern Pacific coral (*Porites panamensis*). *Mitochondrial DNA* **1–2**.
- Dolan, E. 2008. Phylogenetics, systematics and biogeography of deep-sea Pennatulacea (Anthozoa: Octocorallia) evidence from molecules and morphology. Southampton.
- Dowsett, H.J., Robinson, M.M. & Foley, K.M. 2009. Pliocene three-dimensional global ocean temperature reconstruction. *Clim. Past* **5**: 769–783.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **7**: 1–8.
- Emblem, Å., Karlsen, B.O., Evertsen, J. & Johansen, S.D. 2011. Mitogenome rearrangement in the cold-water scleractinian coral *Lophelia pertusa* (Cnidaria, Anthozoa) involves a long-term evolving group I intron. *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**: 495–503. Elsevier Inc.
- Erba, E. 2004. Calcareous nannofossils and Mesozoic oceanic anoxic events. *Mar. d*
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V.J., *et al.* 2004. Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> (sub 2) on the CaCO<sub>3</sub> (sub 3) system in the oceans. *Science (80-. )*. **305**: 362–366.
- Filkorn, H.F. & Alor, J.P. 2004. A New Early Cretaceous Coral (Anthozoa; Scleractinia; Dendrophylliina) and Its Evolutionary Significance. *J. Paleontol.* **78**: 501–512.
- Flot, J.F. & Tillier, S. 2007. The mitochondrial genome of *Pocillopora* (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: The putative D-loop and a novel ORF of unknown function. *Gene* **401**: 80–87.
- Fluteau, F., Ramstein, G., Besse, J., Guiraud, R. & Masse, J.P. 2007. Impacts of palaeogeography and sea level changes on Mid-Cretaceous climate. **247**: 357–381.

- Forsman, Z.H., Barshis, D.J., Hunter, C.L. & Toonen, R.J. 2009. Shape-shifting corals: molecular markers show morphology is evolutionarily plastic in *Porites*. *BMC Evol. Biol.* **9**: 1–9.
- Freitas, L.M., Oliveira, M.D.M. & Kikuchi, R.K.P. 2012. Os mecanismos de sobrevivência dos corais diante do impacto das mudanças climáticas sobre o ecossistema de recifes. *Cad. Geociências* **9**: 142–156.
- Freiwald, A., Fossa, J.H., Grehan, A., Koslow, T. & Roberts, J.M. 2004a. *Cold-water coral reefs*.
- Freiwald, A., Fossa, J.H., Grehan, A., Koslow, T. & Roberts, J.M. 2004b. *Cold-water coral reefs Out of sight – no longer out of mind Cold-water coral reefs* (UNEP-WCMC, ed). Cmbridge.
- Frieke, H.W., Vareschi, E. & Schlichter, D. 1987. Photoecology of the coral *Leptoseris fragilis* in the Red Sea twilight zone (an experimental study by submersible). *Oecologia* **73**: 371–381.
- Fukami, H., Budd, A.F., Paulay, G., Sole, A., Chen, C.A., Iwao, K., *et al.* 2004. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature* **427**: 2–5.
- Fukami, H., Chen, C.A., Budd, A.F., Collins, A., Wallace, C., Chuang, Y.-Y., *et al.* 2008. Mitochondrial and nuclear genes suggest that stony corals are monophyletic but most families of stony corals are not (Order Scleractinia, Class Anthozoa, Phylum Cnidaria). *PLoS One* **3**: e3222.
- Fukami, H., Chen, C.A., Chiou, C.Y. & Knowlton, N. 2007. Novel group I introns encoding a putative homing endonuclease in the mitochondrial *cox1* gene of scleractinian corals. *J. Mol. Evol.* **64**: 591–600.
- Fukami, H. & Knowlton, N. 2005. Analysis of complete mitochondrial DNA sequences of three members of the *Montastraea annularis* coral species complex (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *Coral Reefs* **24**: 410–417.
- Fukami, H., Omori, M. & Hatta, M. 2000. Phylogenetic relationships in the coral family acroporidae, reassessed by inference from mitochondrial genes. *Zoolog. Sci.* **17**: 689–696.
- Gale, A.S. 2000. The Cretaceous world. In: *Biotic Response to Global Change: The Last 145 Million Years* (S. Culver & P. F. Rawson, eds), pp. 2–19. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Gattuso, J.P., Lee, K., Rost, B. & Schulz, K. 2010. Seawater carbonate chemistry. In: *Guide to Best Practices for Ocean Acidification Research and Data Reporting* (U. I. f. Riebesell, V. J. Fabry, L. Hansson, & J.-P. Gattuso, eds), pp. 41–52. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Gautret, P., Cuif, J. & Freiwald, A. 1997. Composition of Soluble Mineralizing Matrices in Zooxanthellate and Non-zooxanthellate Scleractinian Corals : Biochemical Assessment of Photosynthetic Metabolism through the Study of a Skeletal Feature. **36**: 189–194.
- Geel, T. 2000. Recognition of stratigraphic sequences in carbonate platform and slope deposits: empirical models based on microfacies analysis of Palaeogene deposits in southeastern Spain. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **155**: 211–238.
- Goddard, M.R. & Burt, A. 1999. Recurrent invasion and extinction of a selfish gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 13880–13885.
- Graham, N.A.J. & Nash, K.L. 2013. The importance of structural complexity in coral reef ecosystems. *Coral Reefs* **32**: 315–326.

- Grassle, J.F. & Maciolek, N.J. 1992. Deep-sea species richness: regional and local diversity estimates from quantitative bottom samples. *Am. Nat.* **139**: 313–341.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**: 307–21.
- Guinotte, J.M., Orr, J., Freiwald, A., Morgan, L. & George, R. 2006. Will human-induced changes in seawater chemistry alter the distribution of deep-sea scleractinian corals? *Front. Ecol. Environ.* **4**: 141–146.
- Hallam, A. & Cohen, J.M. 1989. The case for sea-level change as a Dominant causal factor in mass extinction of marine invertebrates [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* **325**: 437–455.
- Hallock, P. 2005. Global change and modern coral reefs: new opportunities to understand shallow-water carbonate depositional processes. *Sediment. Geol.* **175**: 19–33.
- Hautmann, M. 2004. Effect of end-Triassic CO<sub>2</sub> maximum on carbonate sedimentation and marine mass extinction. *Facies* **50**: 257–261.
- Hayward, B.W. 1977. Lower miocene corals from the Waitakere Ranges, North Auckland, New Zealand. *J. R. Soc. New Zeal.* **7**: 99–111.
- Heydt, A. Von Der & Dijkstra, H.A. 2006. Effect of ocean gateways on the global ocean circulation in the late Oligocene and early Miocene. *Paleoceanography* **21**: 1–18.
- Hinderstein, L.M., Marr, J.C.A., Martinez, F.A., Dowgiallo, M.J., Puglise, K.A., Pyle, R.L., *et al.* 2010. Theme section on “Mesophotic Coral Ecosystems: Characterization, Ecology, and Management.” *Coral Reefs* **29**: 247–251.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, a J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., *et al.* 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* **318**: 1737–42.
- Hönisch, B., Ridgwell, A., Schmidt, D.N., Thomas, E., Gibbs, S.J., Sluijs, A., *et al.* 2012. The geological record of ocean acidification. *Science* **335**: 1058–1063.
- Houghton, J.T., Filho, L.G.M., Callender, B.A., Harris, N., Kattenberg, A. & Maskell, K. 1995. *Climate change 1995: The science of climate change*. Cambridge University Press, New York.
- Huang, D., Licuanan, W.Y., Baird, A.H. & Fukami, H. 2011. Cleaning up the “Bigmessidae”: molecular phylogeny of scleractinian corals from *Faviidae*, *Merulinidae*, *Pectiniidae* and *Trachyphylliidae*. *BMC Evol. Biol.* **11**: 37.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P. a. & Chou, L.M. 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *J. Mol. Evol.* **66**: 167–174.
- Hughes, T.P., Baird, a H., Bellwood, D.R., Card, M., Connolly, S.R., Folke, C., *et al.* 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* **301**: 929–933.
- Iglesias-Prieto, R., Beltrán, V.H., LaJeunesse, T.C., Reyes-Bonilla, H. & Thomé, P.E. 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* **271**: 1757–63.
- Inoue, J.G., Miya, M., Miller, M.J., Sado, T., Hanel, R. & Hatooka, K. 2010. Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biol. Lett.* **6**: 363–366.
- Janiszewska, K., Stolarski, J., Benzerara, K., Meibom, A., Mazur, M., Kitahara, M. V, *et al.* 2011. A unique skeletal microstructure of the deep-sea *micrabaciid* scleractinian corals. *J. Morphol.* **272**: 191–203.



- Kahng, S.E., Garcia-Sais, J.R., Spalding, H.L., Brokovich, E., Wagner, D., Weil, E., *et al.* 2010. Community ecology of mesophotic coral reef ecosystems. *Coral Reefs* **29**: 255–275.
- Keller, G. 2003. Biotic effects of impacts and volcanism. *Earth Planet. Sci. Lett.* **215**: 249–264.
- Keller, G. 2005. Biotic effects of late Maastrichtian mantle plume volcanism: implications for impacts and mass extinctions. *Lithos* **79**: 317–341.
- Keller, G. 2008. Cretaceous climate, volcanism, impacts, and biotic effects. *Cretac. Res.* **29**: 754–771. Elsevier Ltd.
- Kerr, A.M. 2005. Molecular and morphological supertree of stony corals (Anthozoa: Scleractinia) using matrix representation parsimony. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **80**: 543–58.
- Kiessling, W. & Baron-Szabo, R.C. 2004. Extinction and recovery patterns of scleractinian corals at the Cretaceous-Tertiary boundary. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **214**: 195–223.
- Kiessling, W. & Simpson, C. 2011. On the potential for ocean acidification to be a general cause of ancient reef crises. *Glob. Chang. Biol.* **17**: 56–67.
- Kiessling, W., Simpson, C. & Foote, M. 2010. Reefs as cradles of evolution and sources of biodiversity in the Phanerozoic. *Science* **327**: 196–8.
- Kitahara, M.V. 2009. A pesca demersal de profundidade e os bancos de corais azooxantelados do sul do Brasil. *Biota Neotrop.* **9**: 35–44.
- Kitahara, M.V. 2011. Morphological and molecular systematics of scleractinian corals (Cnidaria, Anthozoa), with emphasis on deep-water species. James Cook.
- Kitahara, M.V., Cairns, S.D., Stolarski, J., Blair, D. & Miller, D.J. 2010. A comprehensive phylogenetic analysis of the Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa) based on mitochondrial CO1 sequence data. *PLoS One* **5**: e11490.
- Kitahara, M.V., Stolarski, J., Cairns, S.D., Benzoni, F., Stake, J.L. & Miller, D.J. 2012. The first modern solitary *Agariciidae* (Anthozoa, Scleractinia) revealed by molecular and microstructural analysis. *Invertebr. Syst.* **26**: 303–315.
- Kitahara, M. V., Lin, M., Forêt, S., Huttley, G., Miller, D.J. & Chen, C.A. 2014. The naked coral" hypothesis revisited - evidence for and against scleractinian monophyly. *PLoS One* **9**: e94774.
- Kleypas, J. a, McManus, J.W. & Meñez, L. a B. 1999. Environmental Limits to Coral Reef Development: Where Do We Draw the Line? *Am. Zool.* **39**: 146–159.
- Kleypas, J.A., Feely, R.A., Fabry, V.J., Langdon, C., Sabine, C.L. & Robbins, L.L. 2006. *Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research*. NSF, NOAA, and the U.S. Geological Survey, St. Petersburg, FL.
- Knowlton, N. 2001. The future of coral reefs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 5419–25.
- Kora, M. & Abdel-fattah, Z. 2000. Pliocene and Plio-Pleistocene macrofauna from the Red Sea coastal plain (Egypt): Biostratigraphy and biogeography. *Geol. Palaeontol.* **34**: 219–235.
- Lages, B.G., Fleury, B.G., Menegola, C. & Creed, J.C. 2011. Change in tropical rocky shore communities due to an alien coral invasion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **438**: 85–96.
- Lalor, A.M.C. & Távora, V.D.A. 2006. Novos elementos da caralinofauna da formação Pirabas (Mioceno inferior), Estado do Pará. *Geociências* **25**: 187–196.

- Lam, K., Morton, B. & Hodgson, P. 2008. Ahermatypic corals (Scleractinia: Dendrophylliidae, Oculinidae and Rhizangiidae) recorded from submarine caves in Hong Kong. *J. Nat. Hist.* **42**: 729–747.
- Langdon, C., Broecker, W.S., Hammond, D.E., Glenn, E., Fitzsimmons, K., Nelson, S.G., *et al.* 2003. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on the community metabolism of an experimental coral reef. *Glob. Biogeochem.* **17**: 1011.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A. McWilliam, H., Valentin, F., *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics.
- Le Goff-Vitry, M.C., Rogers, A.D. & Baglow, D. 2004. A deep-sea slant on the molecular phylogeny of the Scleractinia. *Mol. Phylogenet. Evol.* **30**: 167–177.
- Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P., Oliveira, M.D.M. & Vasconcellos, V. 2010. Status of Eastern Brazilian coral reefs in time of climate changes. *Panam. J. Aquat. Sci.* **5**: 224–235.
- Leclercq, N., Gattuso, J.P. & Jaubert, J. 2000. CO<sub>2</sub> partial pressure controls the calcification rate of a coral community. *Glob. Chang. Biol.* **6**: 329–334.
- Leclercq, N., Gattuso, J.P. & Jaubert, J. 2002. Primary production, respiration, and calcification of a coral reef mesocosm under increased CO<sub>2</sub> partial pressure. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 558–564.
- Lin, M., Kitahara, M.V., Tachikawa, H., Fukami, H., Miller, D.J. & Chen, C.A. 2012. Novel organization of the mitochondrial genome in the deep-sea coral, *Madrepora oculata* (Hexacorallia, Scleractinia, Oculinidae) and its taxonomic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**: 323–328. Elsevier Inc.
- Lin, M., Luzon, K.S., Licuanan, W.Y., Ablan-lagman, M.C. & Chen, C.A. 2011. Seventy-four universal primers for characterizing the complete mitochondrial genomes of scleractinian coral (Cnidaria; Anthozoa). *Zool. Stud.* **50**: 513–524.
- Lin, M.F., Kitahara, M.V., Luo, H., Tracey, D., Geller, J., Fukami, H., *et al.* 2014. Mitochondrial genome rearrangements in the scleractinia/corallimorpharia complex: Implications for coral phylogeny. *Genome Biol. Evol.* **6**: 1086–1095.
- Lindner, A., Cairns, S.D. & Cunningham, C.W. 2008. From offshore to onshore: multiple origins of shallow-water corals from deep-sea ancestors. *PLoS One* **3**: e2429.
- Lowenstam, H.A. & Weiner, S. 1989. *On Biomineralization*. Oxford University Press, New York.
- Maier, C., Hegeman, J., Weinbauer, M.G. & Gattuso, J.P. 2009. Calcification of the cold-water coral *Lophelia pertusa*, under ambient and reduced pH. *Biogeosciences* **6**: 1875–1901.
- Malik, H.S. & Henikoff, S. 2000. Dual recognition – incision enzymes might be involved in mismatch repair and meiosis. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **25**: 414–418.
- Marubini, F., Pages, C.F., Cuif, J.P., Marubini, F., Ferrier-pages, C. & Cuif, J. 2003. Suppression of skeletal growth in scleractinian corals by decreasing ambient carbonate-ion concentration: a cross-family comparison. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* **179**: 179–184.
- Medina, M., Collins, A.G., Silberman, J.D. & Sogin, M.L. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 9707–12.
- Medina, M., Collins, A.G., Takaoka, T.L., Kuehl, J. V & Boore, J.L. 2006. Naked corals: skeleton loss in Scleractinia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 9096–9100.
- Misof, B. & Patrick, K. 2009. Aliscore - Manual.

- Moberg, F. & Folke, C. 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol. Econ.* **29**: 215–233.
- Murray, R.J., Wheeler, A., Freiwald, A. & Cairns, S.D. 2009. Cold-Water Corals: The Biology and Geology of Deep-Sea Coral Habitat. **23**: 226–227.
- Nicholas, K.B., Jr., N.H.B. & Deerfield, D.W.I. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation.
- Nielsen, H. & Johansen, S.D. 2009. Group I introns: moving in new directions. *RNA Biol.* **6**: 375–383.
- Ogata, H., Ray, J., Toyoda, K., Sandaa, R.-A., Nagasaki, K., Bratbak, G., *et al.* 2011. Two new subfamilies of DNA mismatch repair proteins (MutS) specifically abundant in the marine environment. *ISME J.* **5**: 1143–1151. Nature Publishing Group.
- Pandolfi, J.M. 1999. Response of Pleistocene coral reefs to environmental change over long temporal scales. *Am. Zool.* **39**: 113–130.
- Pante, E., France, S.C., Couloux, A., Cruaud, C., Mcfadden, C.S., Samadi, S., *et al.* 2012. Deep-sea origin and in-situ diversification of chrysogorgiid octocorals. *PLoS One* **7**: 1–14.
- Pearse, V.B. & Muscatine, L. 1971. Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biol. Bull.* **141**: 350–363.
- Perfetta, P.J., Shelton, K.L. & Stitt, J.H. 1999. Carbon isotope evidence for deep-water invasion at the Marjumiid-Pterocephaliid biomere boundary, Black Hills, USA: a common origin for biotic crises on Late Cambrian shelves. *Geology* **27**: 403–406.
- Petit, J.R., Raynaud, D., Basile, I., Chappellaz, J., Ritz, C., Delmotte, M., *et al.* 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* **399**: 429–436.
- Picciani, N., Pires, D.O. & Silva, H.R. 2011. Cnidocysts of Caryophylliidae and Dendrophylliidae (Cnidaria: Scleractinia): Taxonomic Distribution and Phylogenetic Implications. *Zootaxa* **3135**: 35–54.
- Pickering, K.T. 2000. The Cenozoic world. In: *Biotic Response to Global Change: The Last 145 Million Years* (S. Culver & P. F. Rawson, eds), pp. 20–34. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Pickett, J.W., Thompson, C.H., Kelley, R.A. & Roman, D. 1985. Evidence of High Sea Level during Isotope Stage 5c in Queensland, Australia. *Quaternary Res.* **24**: 103–114.
- Pont-Kingdon, G., Okada, N. a., Macfarlane, J.L., Timothy Beagley, C., Watkins-Sims, C.D., Cavalier-Smith, T., *et al.* 1998. Mitochondrial DNA of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion. *J. Mol. Evol.* **46**: 419–431.
- Pont-Kingdon, G.A., Okada, N.A., Macfarlane, J.L., Beagley, C T Wolstenholme, D R Cavalier-Smith, T. & Clark-Walker, G.D. 1995. A coral mitochondrial mutS gene. *Nature* **375**: 109–111.
- Pope, K.O., Baines, K.H., Ocampo, A.C. & Ivanov, B.A. 1997. Energy, volatile production, and climatic effects of the Chicxulub Cretaceous/Tertiary impact. *J. Ge* **102**: 21,645–21,664.
- Puverel, S., Tambutté, E., Zaccola, D., Domart-Coulon, I., Bouchot, A., Lotto, S., *et al.* 2005. Antibodies against the organic matrix in scleractinians: a new tool to study coral biomineralization. *Coral Reefs* **24**: 149–156.

- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., *et al.* 2004. The 1.2-megabase genome sequence of mimivirus. *Science* (80-. ). **306**: 1344–1350.
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoeh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., *et al.* 2005. *Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide*. the Royal Society, London.
- Raymo, M.E., Grant, B., Horowitz, M. & Rau, G.H. 1996. Mid-Pliocene warmth: stronger greenhouse and stronger conveyor. *Mar. Micropaleontol.* **27**: 313–32.
- Riegl, W.E. & Piller, B. 1999. Coral frameworks revisited- reefs and coral carpets in the northern Red Sea. *Coral Reefs* **18**: 241–253.
- Riul, P., Targino, C.H., Júnior, L.A.C., Creed, J.C., Horta, P.A. & Costa, G.C. 2013. Invasive potential of the coral *Tubastraea coccinea* in the southwest Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **480**: 73–81.
- Roberts, J.M., Wheeler, A.J. & Freiwald, A. 2006. Reefs of the deep: the biology and geology of cold-water coral ecosystems. *Science* (80-. ). **312**: 543–547.
- Roberts, J.M., Wheeler, A.J., Freiwald, A. & Cairns, S.D. 2009. *Cold water Corals: the biology and geology of deep-sea coral habitats*, Cambridge. Cambridge University Press, New York.
- Roder, C., Berumen, M.L., Bouwmeester, J., Papathanassiou, E. & Voolstra, C.R. 2013. First biological measurements of deep-sea corals from the Red Sea. *Sci. Rep.* **3**: 1–10.
- Rogers, A.D. 1999. The biology of *Lophelia pertusa* (LINNAEUS 1758) and other deep-water reef-forming Corals and impacts from human activities. *Internat. Rev. Hydrobiol.* **84**: 315–406.
- Rohling, E.J., Fenton, M., Jorissen, F.J., Bertrand, P., Ganssen, G. & Caulet, J.P. 1998. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Lett. to Nat.* **394**: 162–165.
- Romano, S.L. & Cairns, S.D. 2000. Molecular phylogenetic hypotheses for the evolution of scleractinian corals. *Bull. Mar. Sci.* **67**: 1043–1068.
- Romano, S.L. & Palumbi, S.R. 1996. Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics. *Science* (80-. ). **271**: 640–642.
- Romano, S.L. & Palumbi, S.R. 1997. Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in scleractinian corals. *J. Mol. Evol.* **45**: 397–411.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Rosen, B.R. 2000. Algal symbiosis, and the collapse and recovery of reef communities: Lazarus corals across the K±T boundary. In: *Biotic Response to Global Change: The Last 145 Million Years* (S. Culver & P. F. Rawson, eds), pp. 164–180. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Rosen, B.R. & Turnšek, D. 1989. Extinction patterns and biogeography of scleractinian corals across the Cretaceous/Tertiary boundary. *Mem. Assoc. Australas. Palaeontol.* **8**: 355–370.
- Rowan, R.O.B. & Knowlton, N. 1995. Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 2850–2853.
- Royer, D.L. 2006. CO<sub>2</sub>-forced climate thresholds during the Phanerozoic. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**: 5665–5675.
- Santos, L.A.H., Ribeiro, F. V & Creed, J.C. 2013. Antagonism between invasive pest corals *Tubastraea* spp . and the native reef-builder *Mussismilia hispida* in the southwest Atlantic. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **449**: 69–76. Elsevier B.V.

- Scheibner, C. & Speijer, R.P. 2008a. Decline of coral reefs during late Paleocene to early Eocene global warming. *eEarth* **3**: 19–26.
- Scheibner, C. & Speijer, R.P. 2008b. Late Paleocene – early Eocene Tethyan carbonate platform evolution — A response to long- and short-term paleoclimatic change. *Earth Sci. Rev.* **90**: 71–102. Elsevier B.V.
- Schneider, K. & Erez, J. 2006. The effect of carbonate chemistry on calcification and photosynthesis in the hermatypic coral *Acropora eurystoma*. *Limnol. Oceanogr.* **51**: 1284–1293.
- Scott, R.W. 1995. Global environmental controls on Cretaceous reefal ecosystems. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **119**: 187–199.
- Sentoku, A. & Ezaki, Y. 2012. Constraints on the formation of colonies of the extant azooxanthellate scleractinian coral *Dendrophyllia arbuscula*. *Lethaia* **45**: 62–70.
- Sentoku, A. & Ezaki, Y. 2013. Intrinsic constraints on sympodial growth morphologies of azooxanthellate scleractinian coral *Dendrophyllia*. *PLoS One* **8**: e63790.
- Shearer, T.L., Van Oppen, M.J.H., Romano, S.L. & Worheire, G. 2002. Slow mitochondria DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol. Ecol.* **11**: 2475–2487.
- Shi, X., Tian, P., Lin, R., Lan, W., Niu, W. & Zheng, X. 2014. Complete mitochondrial genome of disc coral *Turbinaria peltata* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Mitochondrial DNA* 1–2.
- Smith, K.E. & Thatje, S. 2012. The secret to successful deep-sea invasion : does low temperature hold the key ? *PLoS One* **7**: 30–33.
- Smith, S. V & Buddemeier, R.W. 1992. Global change and coral reef ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**: 89–118.
- Stanley, G.D.J. 1981. Early history of scleractinian corals and its geological consequences. *Geology* **9**: 507–511.
- Stanley, G.D.J. 2003. The evolution of modern corals and their early history. *Earth-Science Rev.* **60**: 195–225.
- Stanley, G.J. & Helmle, K.P. 2010. Middle Triassic coral growth bands and their implication for photosymbiosis. *Palaios* **25**: 754–763.
- Stanley, S.M. & Hardie, L.A. 1998. Secular oscillations in the carbonate mineralogy of reef-building and sediment-producing organisms driven by tectonically forced shifts in seawater chemistry. **144**: 3–19.
- Stoddart, D.R. 1990. Coral reefs and islands and predicted sea-level rise. *Prog. Phys. Geogr.* **14**: 521–536.
- Stolarski, J. 1996. Paleogene corals from Seymour Island, Antarctic peninsula. *Palaeontol. Results Polish Antart. Exped. Part II. - Palaeontol. Pol.* **55**: 51–63.
- Stolarski, J., Kitahara, M. V, Miller, D.J., Cairns, S.D., Mazur, M. & Meibom, A. 2011. The ancient evolutionary origins of Scleractinia revealed by azooxanthellate corals. *BMC Evol. Biol.* **11**: 316.
- Tajika, E. 1999. Carbon cycle and climate change during the Cretaceous inferred from a biogeochemical carbon cycle model. *Isl. Arc* **8**: 293–303.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–9.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *Lectures on mathematics in the life sciences* (M. R. M., ed), pp. 57–86. American Mathematical Society.
- Tseng, C.C., Wallace, C.C. & Chen, C.A. 2005. Mitogenomic analysis of *Montipora cactus* and *Anacropora matthai* (cnidaria; scleractinia; acroporidae) indicates an

- unequal rate of mitochondrial evolution among Acroporidae corals. *Coral Reefs* **24**: 502–508.
- Turnšek, D. & Košir, A. 2004. *Bacarella vipavica* n. gen., n. sp. (Anthozoa, Scleractinia) from reefal blocks in Lower Eocene carbonate megabeds in the Vipava Valley (SW Slovenia). *Razpr. IV. Razreda Sazu* **45**: 145–169.
- Van Oppen, M.J.H., Catmull, J., McDonald, B.J., Hislop, N.R., Hagerman, P.J. & Miller, D.J. 2002. The mitochondrial genome of *Acropora tenuis* (Cnidaria; Scleractinia) contains a large group I intron and a candidate control region. *J. Mol. Evol.* **55**: 1–13.
- Van Oppen, M.J.H., Hislop, N.R., Hagerman, P.J. & Miller, D.J. 1999. Gene Content and Organization in a Segment of the Mitochondrial Genome of the Anthozoan Subclass Zoantharia. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1812–1815.
- Van Oppen, M.J.H., Willis, B.L. & Miller, D.J. 1999. Atypically low rate of cytochrome b evolution in the scleractinian coral genus *Acropora*. *Proc. Biol. Sci.* **266**: 179–183.
- , J.E.N. 1995. *Corals in space and time: the biogeography and evolution of the Scleractinia*. Cornell University Press, New York.
- Veron, J.E.N. 1986. *Corals of Australia and the Indo-Pacific*. University of Hawai'i Press, London.
- Veron, J.E.N. 2000. *Corals of the World*. Australian Institute of Marine Science, Townsville.
- Veron, J.E.N. 2008. Mass extinctions and ocean acidification: biological constraints on geological dilemmas. *Coral Reefs* **27**: 459–472.
- Veron, J.E.N. 2011. Ocean acidification and coral reefs: an emerging big picture. *Diversity* **3**: 262–274.
- Veron, J.E.N., Hoegh-Guldberg, O., Lenton, T.M., Lough, J.M., Obura, D.O., Pearce-Kelly, P., *et al.* 2009. The coral reef crisis: the critical importance of <350 ppm CO<sub>2</sub>. *Mar. Pollut. Bull.* **58**: 1428–36. Elsevier Ltd.
- Veron, J.E.N., Odorico, D.M., Chen, C.A. & Miller, D.J. 1996. Reassessing evolutionary relationships of scleractinian corals. *Coral Reefs* **15**: 1–9.
- Vollmer, S. V & Palumbi, S.R. 2002. Hybridization and the evolution of reef coral diversity. *Science* **296**: 2023–2028.
- Wanner, J. 1902. Die Fauna der obersten weissen Kreide der libyschen Wüste. *Palaeontographica* **30**: 91–151.
- Wares, J. 2014. Mitochondrial cytochrome b sequence data are not an improvement for species identification in Scleractinian corals. *PeerJ Prepr.* 1–5.
- Wyman, S.K., Jansen, R.K. & Boore, J.L. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* **20**: 3252–3255.
- Yabe, H. & Sugiyama, T. 1935. Geological and Geographical Distribution of Reef-Corals in Japan. *J. Paleontol.* **9**: 183–217.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. & Billups, K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* **292**: 686–693.
- Zachos, J.C., Dickens, G.R. & Zeebe, R.E. 2008. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature* **451**: 279–83.
- Zachos, J.C., Röhl, U., Schellenberg, S.A., Sluijs, A., Hodell, D.A., Kelly, D.C., *et al.* 2005. Rapid acidification of the ocean during the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Science (80-. )*. **308**: 1611–1615.
- Zamagni, J., Mutti, M. & Košir, A. 2012. The evolution of mid Paleocene-early Eocene coral communities: how to survive during rapid global warming. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **317-318**: 48–65.

Zeng, C., Tracey, D.M., Clark, M.R., Rowden, A. a., Thomas, L.J. & Gardner, J.P. A. 2014. The complete mitochondrial genome of the deep-sea stony coral *Solenosmilia variabilis* (Scleractinia, Caryophylliidae) and its inter-individual variation. *Mitochondrial DNA* 1–2. Informa UK Ltd.